

## A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione S.I.S.S.A SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI N.G.

Residenza Trieste, TS codice 8 0 0 3 5 0 6 0 3 2 8

2) Denominazione  codice

Residenza  codice 1

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome CAPASSO OLGA ed altr. Cod. fiscale

Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Via Piemonte n. 1 2 6 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Via Piemonte n. 1 2 6 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

D. TITOLO classe preposta (sez./cl/sel) gruppo/sottogruppo 

"Animali transgenici non umani esprimenti anticorpi anti-NGF".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO SI NO X SE ISTANZA: DATA  /  /  N° PROTOCOLLO  /  /

E. INVENTORI DESIGNATI cognome e nome cognome e nome

1) CATTANEO Antonino 3) RUBERTI Francesca

2) CAPSONI Simona 4)

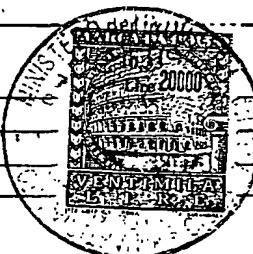
## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	Allegato S/R	SCIOLIMENTO RISERVE
1)					Data <u>/ /</u> N. Protocollo <u></u> / <u></u> / <u></u>
2)					<u>/ /</u> / <u></u> / <u></u>

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione 

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA



## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	n. pag.	n. tav.	descrizione	SCIOLIMENTO RISERVE
Doc. 1) <u>2</u>	<u>5 1</u>	<u>3 2</u>	nassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)	Data <u>/ /</u> N. Protocollo <u></u> / <u></u> / <u></u>
Doc. 2) <u>2</u>			disegno	<u>/ /</u> / <u></u> / <u></u>
Doc. 3) <u>0</u>	<u>RIS</u>		Lettera d' incarico	<u>/ /</u> / <u></u> / <u></u>
Doc. 4) <u>1</u>			designazione inventore	<u>/ /</u> / <u></u> / <u></u>
Doc. 5) <u></u>			documenti di priorità con traduzione in italiano	Confronta singole priorità
Doc. 6) <u></u>			autonizzazione o atto di cessione	<u>/ /</u> / <u></u> / <u></u>
Doc. 7) <u></u>			nominativo completo del richiedente	<u>/ /</u> / <u></u> / <u></u>

8) attestato di versamento, totale lire NOVECENTOQUINDICIMILA obbligatorio

COMPILATO IL 0 5 / 0 6 / 2 0 0 0 FIRMA DEL(I) S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE UN MANDATARIO per me per gli altri  
 RICHIEDENTE(I) Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A. olga Capasso  
CONTINUA SI/NO N O (N° d'iscr. 820 B)

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO S I

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI RM 2000 A 000306 ROMA codice 5 8  
 VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA  Reg. A

anno DUEMILA il giorno CINQUE del mese di GIUGNO

Il (i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha (ha) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 0 0 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE ANNEKE

IL DEPOSITANTE



timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE  
Ufficiale Rogante  
Silvia Allard

BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

## PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA  REG A  DATA DI DEPOSITO 0 | 5 | 0 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0  
 N. MERO BREVETTO  6 DATA DI RILASCIO  /  /   
 A. RICHIEDENTE(I)  
 1) Denominazione   
 2) Denominazione   
 B. RICHIEDENTE(I)  
 1) Denominazione   
 2) Denominazione

## D. TITOLO

"Animali transgenici non umani esprimenti anticorpi anti-NGF"

Classe proposta (sez /cl./scl/)

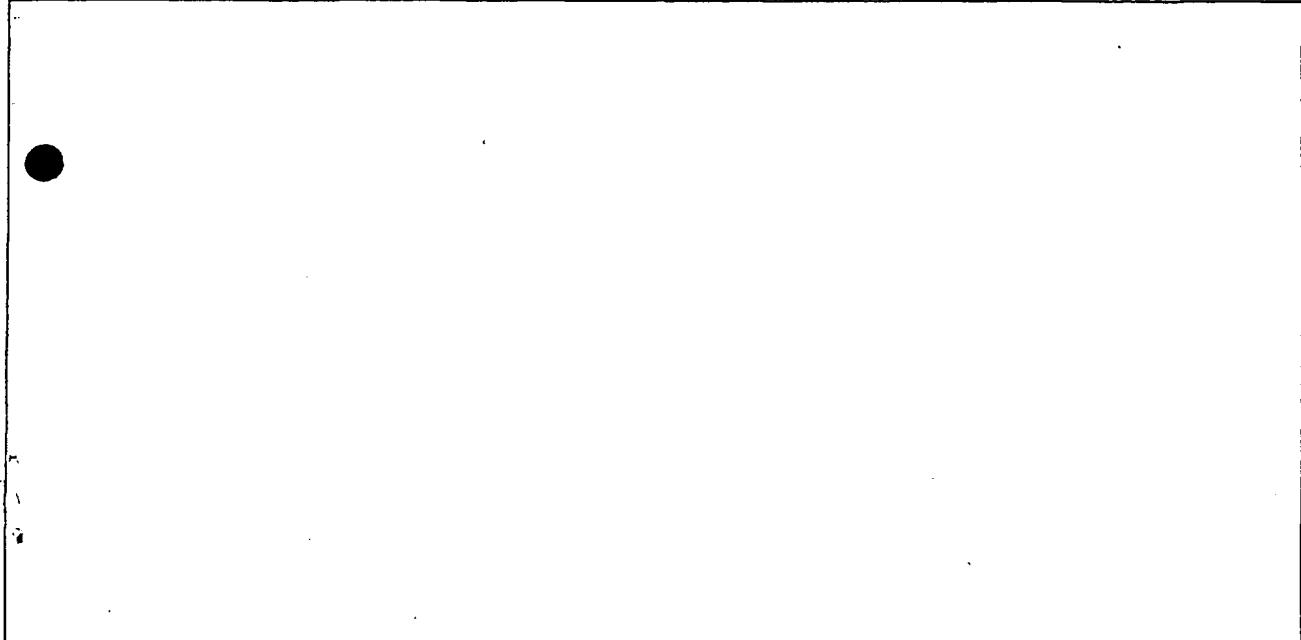
(gruppo/sottogruppo)  /

## L. RIASSUNTO

Sono descritti animali non umani transgenici per un anticorpo anti-NGF (Nerve Growth Factor) in grado di mimare sindromi neurodegenerative, da utilizzarsi come modello per lo studio di tali patologie e per la messa a punto di terapie.



## M. DISEGNO



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "Animali transgenici non umani esprimenti anticorpi anti-NGF" a nome: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati inventori: Cattaneo Antonino, Capsoni Simona, Ruberti Francesca

\* \* \* \*

Campo tecnico

La presente invenzione concerne animali non umani transgenici per un anticorpo anti-NGF (Nerve Growth Factor) in grado di mimare sindromi neurodegenerative, da utilizzarsi come modello per lo studio di tali patologie e per la messa a punto di terapie.

Stato della tecnica

Il Nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini, 1952) è una neurotrofina pleiotropica che esercita un ruolo fondamentale nel differenziamento neuronale, sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico. L'NGF risulta infatti indispensabile per il differenziamento dei neuroni colinergici del telencefalo basale, dei neuroni sensitivi e di quelli del sistema nervoso simpatico.

L'NGF è necessario anche in fasi successive al differenziamento, in quanto in grado di regolare i fenomeni di apoptosi cellulare (Davies, 1992), la sintesi di elementi del citoscheletro durante la rigenerazione dell'assone (Snider, 1989), la sintesi di neurotrasmettitori peptidici ed enzimatici (Eide et al., 1993), il riarrangiamento sinaptico e la proliferazione neuronale (Schnell et al., 1994) e che giochi quindi un

ruolo cruciale anche nei processi neurodegenerativi e nell'invecchiamento neuronale (Connor & Dragunow, 1998).

I meccanismi di azione che regolano attività così diverse, rimangono ancora da chiarire: l'azione pleiotropica dell'NGF e la mancanza di modelli animali adulti non permettono di correlare la sua espressione ad un solo e definito fenotipo o ad una determinata e riconoscibile funzione. L'inattivazione dell'NGF in modelli animali adulti, è stata tentata mediante diversi approcci, tra cui una l'immunoneutralizzazione con la veicolazione ("delivery") sistemica di anticorpi neutralizzanti anti-NGF (Levi-Montalcini et al., 1960), o mediante il "knockout" del gene in topi transgenici (Crowley et al., 1994).

Tuttavia i risultati sono stati, in entrambi i casi, piuttosto deludenti, in quanto gli anticorpi forniti sistematicamente non superano la barriera ematoencefalica, e l'effetto di neutralizzazione dell'NGF negli altri distretti dipende da troppi altri fattori poco standardizzabili quali l'affinità e il titolo dell'antisiero, la velocità di clearance o la cross-reattività dell'anticorpo policlonale con altre neurotrofine, ecc.

D'altra parte, l'approccio di inattivazione molecolare in topi ("knockout") ha permesso di confermare l'importanza di questa neurotrofina e la non ridondanza del suo sistema di signalling intracellulare, ma ha mancato di fornire il modello adulto atteso per lo studio dell'NGF: infatti i topi transgenici  $ngf^{-/-}$  muoiono poco dopo la nascita prima di un eventuale sviluppo di patologie degenerative. Anche il fenotipo di topi eterozigoti  $ngf^{+/-}$  è risultato poco utile allo studio delle

patologie associate alla mancanza di NGF nell'adulto: il topo eterozigote ha un livello di NGF solo del 25% inferiore al controllo, presenta solo un fenotipo di debole deficit colinergico, senza anomalie evidenti e correlabili con patologie neurodegenerative umane.

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono tuttavia che l'NGF rivesta un ruolo chiave in sindromi neurodegenerative (Connor & Dragunow, 1998). La demenza senile e la malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) sono sindromi neurodegenerative caratterizzate da demenza progressiva. La malattia di Alzheimer colpisce il 5% delle persone intorno ai 70 anni e più del 30% delle persone intorno agli 80 anni. La sua incidenza, in relazione al miglioramento delle condizioni di vita ed al prolungamento dell'età media, è destinata a raddoppiare nei prossimi trenta anni. I costi sociali di tale patologia sono elevatissimi. La malattia di Alzheimer colpisce dapprima i neuroni della corteccia cerebrale ed è caratterizzata sia da sintomi clinici (come per esempio, la perdita progressiva delle capacità cognitive) sia da caratteristici segni patologici (che possono essere diagnosticati solo post-mortem), come la formazione di placche extracellulari di proteina  $\beta$ -amiloide, aggregazioni intracellulari neurofibrillari, costituite da proteina tau iperfosforilata, e «perdita neuronale» (Goedert, 1993; Mandelkow e Mandelkow, 1993; Selkoe, 1994). Nel sistema nervoso centrale, il sistema colinergico è particolarmente colpito, con una diminuzione della sintesi di acetilcolina da parte dei neuroni colinergici del telencefalo basale ed una perdita selettiva di tali neuroni. I neuroni colinergici sono

dipendenti dall'NGF che agisce attraverso i recettori ad alta (TrkA) e a bassa affinità (p75). La malattia di Alzheimer è associata inoltre a disturbi motori dovuti sia alla perdita delle capacità cognitive e di coordinazione, sia a patologie proprie del muscolo scheletrico come la depositazione di amiloide nelle cellule muscolari scheletriche (Fukuchi et al., 1998; Jin et al., 1998). E' interessante ricordare che l'NGF esercita una funzione anche su cellule non neuronali, anche per la presenza di recettori per l'NGF a bassa e ad alta affinità (p75, TrkA) anche su cellule muscolari, e per il ritrovamento di isoforme diverse del recettore TrkA apparentemente non espresse nel sistema nervoso.

Nonostante gli enormi investimenti effettuati, non esiste a tutt'oggi una diagnosi precoce, nè una terapia adeguata per l'AD. Ciò è dovuto, soprattutto, alla mancanza di modelli sperimentali cellulari o animali che riproducano in modo completo e fedele la formazione delle strutture neuropatologiche aberranti. Negli ultimi anni sono stati proposti diversi modelli transgenici per la definizione dell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer e per la selezione di composti utili nella terapia della malattia. A partire dall'osservazione delle caratteristiche istologiche, immunologiche e molecolari della malattia di Alzheimer, quali la presenza di depositi di proteina  $\beta$ -amiloide nel sistema nervoso centrale, in particolare a livello della corteccia cerebrale e nell'ippocampo, sono stati derivati animali transgenici in cui il precursore della proteina  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ APP) wild-type viene espresso a livelli superiori a quelli endogeno, o viene espresso in forma mutata con mutazioni riscontrate



nelle forme genetiche della malattia (Hsiao, WO 97/87492 e Games, WO 96/40896). Altri modelli transgenici proposti riguardano animali in cui il transgene è la presenilina-1 o -2 (Citron et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997), da sola o insieme con il precursore della proteina amiloide (Amyloid Precursor Protein, APP) (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999), la proteina tau (Gotz et al., 1995; Brion et al., 1999) o il frammento C-99 della proteina  $\beta$ APP (Jin et al., 1998).

Tutti i modelli finora proposti tuttavia, sviluppano solo alcuni dei markers morfologici, istologici, o molecolari definiti come caratteristici per la diagnosi della malattia di Alzheimer e non rappresentano pertanto dei modelli completi, effettivamente utilizzabili per lo studio e la messa a punto di terapie efficaci e per la sperimentazione di farmaci.

#### Descrizione dell'invenzione

Nella presente invenzione viene descritto un animale transgenico non umano che esprime ubiquitariamente un anticorpo neutralizzante anti-NGF. Viene inoltre descritto il metodo di preparazione dell'animale transgenico ed l'utilizzo di questo modello di knockout fenotipico, per la valutazione degli effetti pleiotropici dell'NGF. Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda l'uso del topo transgenico come modello animale per le sindromi neurodegenerative, associate o meno a patologie muscolari, quali la malattia di Alzheimer, ed il suo uso per la selezione di composti in grado di bloccare la degenerazione neuronale o la perdita di funzionalità muscolare. Un ulteriore aspetto della presente invenzione è riferito all'uso di NGF per la correzione di patologie

muscolari e del deficit colinergico a livello cerebrale e di patologie neurodegenerative, come AD.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione descrive un animale transgenico non umano, che esprime un anticorpo neutralizzante anti-NGF (Nerve Growth Factor). L'anticorpo utilizzato ( $\alpha$ D11) lega l'NGF in corrispondenza di un epitopo responsabile del legame con il suo recettore ad alta affinità, TrkA, bloccandone il legame, e risulta quindi essere un anticorpo neutralizzante. L'epitopo riconosciuto dall'anticorpo  $\alpha$ D11 (comprendente gli aminoacidi 41-49 dell'NGF) corrisponde ad una sequenza poco conservata nella famiglia delle neurotrofine, ed è quindi specifico del NGF. Alternativamente possono essere utilizzati anticorpi che sono in grado di bloccare il «signalling» intracellulare. Alternativamente l'anticorpo ricombinante può essere nella forma Fab, Fv o single chain Fv.

Sorprendentemente gli autori dell'invenzione hanno trovato che topi transgenici per anticorpi anti-NGF, che non esprimono apprezzabili livelli di anticorpo nell'immediato periodo post-natale e che esprimono tale anticorpo a livelli compresi tra 50 e 500 ng/ml nel periodo adulto, sviluppano un complesso quadro patologico, le cui principali caratteristiche sono:

- 1) distrofia muscolare, particolarmente a livello degli arti posteriori;

- 2) dilatazione dei ventricoli cerebrali, segno che viene spesso utilizzato in clinica come indice di malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer (Luxenbergs et al., 1987);
- 3) atrofia della corteccia cerebrale associata in qualche caso alla totale scomparsa dell'ippocampo;
- 4) perdita di neuroni e/o apoptosi, segno posto in relazione alla malattia di Alzheimer (Mizutani et al., 1990);
- 5) deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel SNC, a livello della corteccia paracingolare e del neostriato;
- 6) deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel muscolo scheletrico;
- 7) grovigli (tangles) neurofibrillari e neuriti distrofici;
- 8) deficit cognitivi caratterizzati da difetti nella «working memory» e deficit di orientamento spaziale;
- 9) deficit colinergico;
- 10) iperfosforilazione della proteina tau a livello cerebrale;
- 11) iperfosforilazione della proteina tau nel muscolo;
- 12) infiltrazione di cellule di tipo infiammatorio nel muscolo;
- 13) alterazioni dell'innervazione simpatica della milza e riduzione della vitalità degli splenociti;
- 14) aggregazione della proteina tau nel cervello.

Un aspetto della presente invenzione riguarda l'animale transgenico anti-NGF come modello di studio per le patologie indotte da deprivazione di NGF. La deprivazione di NGF a livello sistematico potrebbe avere diverse eziologie, anche di carattere autoimmune. A

livello locale, una mancanza o limitata disponibilità di NGF da parte delle cellule bersaglio, può essere causata ad esempio da eventi traumatici (denervazione).

Sorprendentemente, molte delle caratteristiche del modello animale transgenico descritto nella presente invenzione, sono del tutto assimilabili a quelle presentate a livello macroscopico, istologico e molecolare dai malati di Alzheimer. La presente invenzione fornisce quindi un modello transgenico animale non umano per lo studio della malattia di Alzheimer. Le caratteristiche di questo modello sono riassunte in tabella 1, dove vengono riportate in confronto con quelle di altri modelli di animali transgenici proposti per questa malattia. Come appare dalla tabella 1 l'animale transgenico della presente invenzione presenta caratteristiche che, nel loro complesso, non sono mai state osservate nei modelli animali finora messi a punto (Hsiao et al, 1996 e WO 95/20666 e WO 97/48792; Citron et al, 1997; Borchelt et al, 1997; Holcomb et al, 1998; Wong et al, 1999; Gotz et al, 1995; Brion et al., 1999, Jin et al; 1998; Games et al, 1995; Irizzary et al, 1997).

segue tabella 1



Tabella 1

DEFICIT	topo transgenico per APP <sup>1,5,9,10</sup>	Topo transgenico per PS-1 <sup>2</sup>	topo transgenico per APP e PS-1 <sup>3,4,5</sup>	topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>6</sup>	topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>7</sup>	topo transgenico per il frammento C-99 di $\beta$ PP <sup>8</sup>	topo transgenico per anticorpi anti-NGF (topo anti-NGF)
Dimensioni del cervello	-	-	-	-	-	-	++
Diminuzione di spessore della corteccia cerebrale	-	-	-	-	-	-	+++
Atrofia del cervelletto	-	-	-	-	-	-	+++
Dilatazione dei ventricoli cerebrali	-	-	-	-	-	-	+++
Deficit della memoria e dell'orientamento	++	-	-	-	-	-	+++
Perdita neuronale	-	-	-	-	-	-	++
Apoptosi	-	-	-	-	-	-	++
Piaghe amiloidee	++	++	++	-	-	-	++
Iperfosforilazione di tau	-	-	-	-	++	++	++
Neurofibrillary tangles/ neurofil threads	++	-	-	-	+	-	+++
Attivazione delle cellule della microglia	-	-	-	-	+	-	++
Deficit colinergico	+	-	-	-	-	-	+++
Atrofia dei muscoli scheletrici	-	-	-	-	-	++	+++
Depositi amiloidei nei muscoli scheletrici (colorazione Congo Red)	-	-	-	-	-	++	++

segue

DEFICIT	topo transgenico per APP <sup>1,5,9,10</sup>	Topo transgenico per PS-1 <sup>2</sup>	topo transgenico per APP e PS-1 <sup>3,4,5</sup>	topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>6</sup>	topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>7</sup>	topo transgenico per il frammento C-99 di $\beta$ PP <sup>8</sup>	topo transgenico per anticorpi anti-NGF (topo anti-NGF)
Depositi amiloidei nel muscolo scheletrico (anti-APP IH)	-	-	-	-	-	++	++
Tau iperfosforilata nel muscolo (IH)	-	-	-	-	-	-	+
Infiltrazione di macrofagi	-	-	-	-	-	+++	+++
Vacuolizzazione delle fibre muscolari	-	-	-	-	-	+++	++
Aumento del numero di nuclei in posizione centrale (miofibra)	-	-	-	-	-	++	++

<sup>1</sup>Hsiao et al., 1996.

<sup>2</sup>Citron et al., 1997.  
<sup>3</sup>Borchelt et al., 1997.

<sup>4</sup>Holcomb et al., 1998.

<sup>5</sup>Wong et al., 1999.<sup>6</sup>Gotz et al., 1995.  
<sup>7</sup>Brion et al., 1999.

<sup>8</sup>Jin et al., 1998.

<sup>9</sup>Games et al., 1995.  
<sup>10</sup>Irizzary et al., 1997.

Risulta quindi evidente che l'animale transgenico della presente invenzione costituisce un modello animale per la malattia di Alzheimer molto più completo di quelli finora proposti. I deficit riscontrati nel topo anti-NGF, dovuti all'espressione del transgene, sono infatti a livello del sistema nervoso centrale e periferico, a livello cognitivo, a livello muscolare ed inoltre a livello morfologico-funzionale nella milza dove possono essere riscontrate anomalie nel pattern di espressione delle immunoglobuline. Risultano a questo proposito particolarmente interessanti le crescenti evidenze sperimentali che indicano come centrale il ruolo del sistema immunitario nello sviluppo della malattia di Alzheimer (Kalaria, 1993).

La preparazione dell'animale transgenico è effettuata per incrocio di due ceppi di topi transgenici parentali (progenitori), di cui uno transgenico per la catena pesante di un anticorpo anti-NGF e l'altro per la catena leggera, ed è questo metodo di preparazione un ulteriore aspetto della presente invenzione. I due ceppi di animali transgenici parentali vengono preparati mediante microiniezione del DNA plasmidico in cellule ES o nell'oocita fecondato secondo metodiche standard, conosciute al tecnico del ramo.

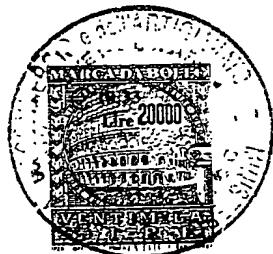
I vettori plasmidici contenenti le unità trascrizionali per l'espressione del cDNA di una e dell'altra delle due catene immunoglobuliniche vengono purificati, ad esempio mediante bandeggio in un gradiente continuo di CsCl, quindi diluiti in soluzioni fisiologica. I vettori possono essere microiniettati tal quali nel pronucleo di oociti fecondati, possono essere linearizzati mediante restrizione

enzimatica in un sito unico, oppure le unità trascrizionali separate mediante restrizione enzimatica dal vettore, purificate ad esempio mediante gel elettroforesi o colonnine a scambio ionico, ed introdotte separatamente nei pronuclei. Preferibilmente l'oocita è di topo, ancor più preferibilmente del ceppo B6SJL. Le due catene

---

immunoglobuliniche dell'anticorpo anti-NGF possono essere chimeriche, ottenute per assemblaggio delle regioni variabili murine di un anticorpo monoclonale anti-NGF, quale il Mab  $\alpha$ D11, con le regioni costanti delle catene leggere K e pesanti  $\gamma$ 1 umane, come descritto nella presente invenzione, oppure derivate tal quali dal cDNA specifico dell'ibridoma secernente. L'espressione delle due catene anticorpali nel topo transgenico è controllata da un promotore forte o virale, quale il CMV-IE (Cytomegalovirus Immediate Early), che viene espresso ubiquitariamente. Altri promotori ubiquitari che possono essere utilizzati sono il promotore del LTR di RSV (Rous Sarcoma Virus) o il promotore dei geni precoci di SV40 (SV40-IE). In una ulteriore realizzazione dell'invenzione, i due transgeni possono essere posti sotto il controllo di due promotori differenti al fine di modulare l'espressione dell'anticorpo correttamente assemblato e funzionale solo in particolari distretti dell'organismo. Al fine di ottenere l'espressione dell'anticorpo funzionale localizzata solo in un particolare distretto o regolata nel tempo, possono tuttavia essere utilizzati promotori tessuto specifici o inducibili che potranno anche essere diversi tra le due catene anticorpali.

La preparazione dell'animale transgenico effettuata secondo il metodo dell'invenzione determina l'espressione dell'anticorpo



funzionale nell'animale transgenico adulto a livelli circa 2000 volte superiori che alla nascita e questo consente da un lato di aumentare l'efficienza di ottenimento di prole vitale transgenica per entrambe le catene dell'anticorpo, secondo il metodo dell'invenzione, fino all'80%, e dall'altro di mettere in evidenza il fenotipo dovuto all'azione dell'NGF

so lo nel periodo adulto, evitando la neutralizzazione dell'NGF durante il differenziamento neuronale.

I topi transgenici derivati secondo il metodo dell'invenzione esprimono, a vari livelli e comunque in quantità compresa tra 50 e 500 ng/ml di siero, l'anticorpo chimerico funzionale costituito da entrambe le catene correttamente assemblate e secrete e non sviluppano un fenotipo letale nelle prime fasi di vita postnatale, al contrario di quanto avviene per l'animale transgenico ottenuto per microiniezione dei plasmidi codificanti per entrambe le catene immunoglobuliniche nello stesso oocita.

Gli esperimenti degli autori dell'invenzione hanno evidenziato come la patologia neurodegenerativa a livello di encefalo sia preceduta da una precoce (a 2 mesi) iperfosforilazione di tau e deposizione di amiloide nel muscolo scheletrico del dorso e degli arti inferiori. Rientra pertanto nella presente invenzione uso del monitoraggio del muscolo scheletrico per una diagnosi precoce di malattie neurodegenerative.

E' stato inoltre osservato che il fenotipo a carico dell'apparato muscolare del topo anti-NGF può revertire mediante somministrazione locale di NGF. Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione è quindi diretta all'uso di NGF per la preparazione di composizioni farmaceutiche

di utilizzo nella terapia di patologie muscolari, quali le distrofie/atrofie muscolari. La somministrazione di questa neurotrofina può essere effettuata con diverse modalità tra cui: iniezione intramuscolare di NGF, ad esempio ricombinante, sciolto in opportune soluzioni fisiologiche, oppure per mezzo di iniezione diretta di vettori plasmidici o virali ricombinanti, ad esempio adenovirus, oppure mediante impianto nel muscolo di cellule geneticamente ingegnerizzate per la secrezione di NGF. Il dosaggio può dipendere da diverse variabili quali l'attività specifica della proteina, la gravità della patologia da trattare, le condizioni generali di salute del paziente e potrà comunque essere compreso tra 2-100 µg /kg di peso corporeo.

#### Descrizione delle figure

**Figura 1. Caratterizzazione molecolare dei topi transgenici progenitori (A):** Unità trascrizionali utilizzate per la produzione del topo transgenico: catena leggera (pannello superiore) e catena pesante (pannello inferiore). CK e CH1-CH3, regioni costanti umane delle catene leggere (K) e pesanti ( $\gamma$ 1); regioni variabili delle catene leggere (VL) e pesanti (VH) dell'anticorpo monoclonale  $\alpha$ D11; pCMV promotore di Cytomegalovirus. (B): Schema dell'incrocio effettuato per la generazione del topo transgenico anti-NGF esprimente l'anticorpo anti-NGF funzionale. VK- $\alpha$ D11 X VH- $\alpha$ D11 (VK: linea progenitrice transgenica per la catena leggera dell'anticorpo  $\alpha$ D11; VH : linea progenitrice transgenica per la catena pesante dell'anticorpo  $\alpha$ D11. (C): Analisi mediante PCR dei transgeni VK (pannello superiore) e VH (pannello inferiore). Il gel mostra l'analisi effettuata su 12 topi omozigoti

incrociati con topi non transgenici. (D): Analisi mediante Dot blot di quattro linee di topi esprimenti la catena leggera o pesante dell'anticorpo  $\alpha$ D11 (VK- $\alpha$ D11 o VH- $\alpha$ D11). (E): Livelli di VH- $\alpha$ D11 (sinistra) e VK- $\alpha$ D11 (destra) misurati nel cuore al tempo P1 giorno e P90 giorni mediante analisi di Phosphoimaging, normalizzati per l'mRNA di  $\beta$ -actina (media delle conte +/- SEM).

**Figura 2. Espressione dell'anticorpo anti-NGF funzionale in cellule neuronali** (A): Espressione della catena VH in cellule di Purkinje del cervelletto di topo progenitore transgenico per la catena pesante (linea C: controllo negativo). Valore della barra di scala=38  $\mu$ m. (B): Espressione di VK (sinistra) e VH (centro) nei DRG (Dorsal Root Ganglia) di topi anti-NGF della famiglia 1 di topi (transgenici per entrambe le catene). La co-espressione di entrambe le catene nella stessa cellula è mostrata nel pannello di destra. Valore della barra di scala=75  $\mu$ m. (C): Livelli di anticorpo ricombinante  $\alpha$ D11 di topi della famiglia 1 e 2 di topi anti-NGF al tempo 1 giorno e 90 giorni, misurati nel siero (sinistra) e nel cervello (destra). La linea punteggiata rappresenta il limite di detezione del saggio (0,1 ng/ml e 0,1 ng/mg, rispettivamente). (D): Topo transgenico di controllo (transgenico solo per VH, sotto) e di un topo anti-NGF della famiglia 3 (sopra), al 17° giorno. Il topo anti-NGF è più piccolo del controllo. (E): Peso corporeo del topo anti-NGF (famiglia 1 e famiglia 2) (sinistra) e di quello di controllo (destra).

**Figura 3. Marker istologici e molecolari del topo anti-NGF A-H:** sezioni del telencefalo basale; I-L: sezioni di ippocampo. A-B: colorazione per ChAT. A: topi di controllo; B: topi anti-NGF. C-D:

innervazione colinergica verso la corteccia frontale. CP: caudato/putamen; FC: corteccia frontale; GCC: genus del corpo calloso. C: topo di controllo; D: topo anti-NGF. E-F: colorazione per TrkA. E: topo di controllo; F: topo anti-NGF. G-H: colorazione per p75. G: topo di controllo; H: topo anti-NGF. I-L: colorazione per ChAT. I: topo di controllo; H: topo anti-NGF. Sezioni M ed N: colorazione di Timm per le «mossy fibers» dell'ippocampo. M: topo di controllo; N: topo anti-NGF.

**Figura 4. Dilatazione dei ventricoli cerebrali** Sezioni coronali di encefalo di topi colorate con il metodo di Nissl. I topi anti-NGF "anziani" (15-18 mesi) hanno i ventricoli laterali (VL) dilatati (B) rispetto ai topi di controllo (A). Si osserva atrofia dei nuclei settoippocampali (SHI) e dei nuclei laterali del setto (LS).



**Figura 5. Atrofia della corteccia cerebrale** Sezioni coronali di encefalo di topi ottenute all'altezza del telencefalo basale. La corteccia frontale è atrofica nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A). La barra bianca indica lo spessore della corteccia misurata in uno stesso punto anatomico. (C) Istogramma che mostra il grado di atrofia nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A).

**Figura 6. Atrofia dell'ippocampo** Gli ippocampi (Hp) dei topi di controllo sono perfettamente formati (A) rispetto ai topi transgenici (B). (C) Istogramma che mostra il grado di formazione nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A).

**Figura 7. Apoptosi neuronale** Marcatura di neuroni corticali apoptotici ottenuta con il metodo TUNEL. Nei topi di controllo (A) non si

osservano cellule positive, mentre nei topi anti-NGF (B) si osservano numerosi nuclei con frammentazione del DNA.

**Figura 8. Fosforilazione della proteina tau** I topi transgenici presentano una marcata positività per il segmento N-terminale della proteina tau (B), tau non fosforilata (D) e soprattutto per tau fosforilata (F). Nei topi di controllo non c'è marcatura (A, C, E). La marcatura è soprattutto localizzata a livello della corteccia cerebrale (per esempio in E). La marcatura per il segmento N- terminale della proteina tau (B) è presente in alcune cellule dell'ippocampo (frecce).

**Figura 9. Deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel cervello** Sia l'anticorpo monoclonale anti-APP che l'anticorpo policlonale contro la proteina precursore della  $\beta$ -amiloide evidenziano la presenza di "placche" nella corteccia paracingolare e nel neo-striato in topi di controllo (A) e in maggior numero e di maggiori dimensioni nei topi transgenici anti-NGF (B). In entrambe le figure le frecce puntano alle placche di beta amiloide.

**Figura 10. Western blot di estratti di encefalo di topi anti-NGF e topi di controllo** L'esperimento è stato ottenuto utilizzando gli anticorpi anti-tubulina (A), anti-tau fosforilata AT8 (B) e anti-proteina precursore dell'amiloide (C). I blots sono rappresentativi di 3 esperimenti in cui sono stati utilizzati almeno 3 topi di controllo e 3 topi transgenici per ogni età analizzata.

**Figura 11. Accumulo della proteina tau** La frazione insolubile della proteina tau si accumula negli encefali dei topi anti-NGF a 15 mesi di età. La quantita' di proteina negli estratti è stata valutata usando

l'anticorpo anti-tubulina (A). I tessuti sono stati estratti in modo sequenziale con i tamponi RAB Hi-salt (B), RIPA (C) e con 70% di acido formico (D). La frazione insolubile di tau rappresentata dalle frazioni estratte dal RIPA e dall'acido formico si accumula nei topi anti-NGF ma non negli estratti da topi di controllo. Le colonne 1 e 2 si riferiscono ai topi di controllo, quelle da 3 a 5 ai topi anti-NGF.

Fig. 12. Depositi di amiloide nella corteccia cerebrale di topi anti-NGF (a,c) e topi di controllo (b) I numerosi depositi extracellulari osservati nella corteccia cerebrale dei topi anti-NGF dimostrano una natura di tipo fibrillare. Barra di ingrandimento in a, b=75  $\mu$ m; c=25  $\mu$ m.

Figura 13. Presenza di placche compatte di amiloide Placche compatte di amiloide sono visibili in topi anti-NGF a 6 mesi di età nella sostanza bianca subcorticale (A) e nella corteccia cerebrale (B). La morfologia delle placche in topi anti-NGF di 15 mesi (C) e' simile a quella di placche evidenziate in sezioni di cervello da pazienti Alzheimer (D). Barra di ingrandimento in A 150  $\mu$ m; in B-D = 75  $\mu$ m.

Figura 14. (a,b) Sezioni della corteccia parietale ed (c) entorinale di topi anti-NGF L'anticorpo NFT200 evidenzia la presenza di tangles (grovigli neurofibrillari) in cellule piramidali (frecce) ed in neuriti distrofici (punta di freccia). d, In sezioni di cervello di topi di controllo non è visibile nessuna marcatura. Barra di ingrandimento=25  $\mu$ m.

Figura 15. Marcatura di neuroni con anticorpi anti-NTF200 anti-tangles L'anticorpo NFT200 marca neuroni sia in sezioni di encefalo di topi anti-NGF (G) che in sezioni ottenute da encefalo di pazienti colpiti da Alzheimer (H). Barra di ingrandimento: 50  $\mu$ m.

Figura 16. Progressione temporale della marcatura di neuroni con anticorpi anti-MAP2 Nei topi di controllo, a 2 (A), 6 (C) e 15 (E) mesi di età, la marcatura ottenuta utilizzando l'anticorpo anti-MAP2 è distribuita per tutta la lunghezza dei dendriti. Nei topi anti-NGF, si osserva una diminuzione nel numero dei dendriti marcati ed una ridistribuzione della proteina all'interno dei dendriti. Questa diminuzione è progressiva e colpisce la corteccia cerebrale dei topi anti-NGF a 2(B), 6 (D) e 15 (F) mesi di età. Barra di ingrandimento: 100 µm.

Figura 17. Impregnazione argentica (E,F) L'impregnazione argentica evidenza la presenza di depositi extracellulari (asterischi) associati a neuriti distrofici (frecce) e formazioni simili a tangles (punta di freccia). Barra di ingrandimento: 50 µm.

Figura 18. Colorazione per ChAT Colorazione per colinacetil trasferasi ChAT del proencealo basale di topi transgenici anti-NGF (c) e di topi di controllo (d). Barra di ingrandimento: 200 µm.

Figura 19. Marcatura per proteina tau. A 1 mese di età, mAb AT8 marca tutti i neuroni della corteccia entorinale (A) e della corteccia parietale (B). In entrambe le corteccie la marcatura diminuisce a 1.5 mesi di età (C). A 2 mesi di età, i neuroni positivi per AT8 sono presenti solo nella corteccia entorinale (D), mentre solo pochi neuroni sono marcati nella corteccia parietale (F). Nessun neurone è marcato nella corteccia entorinale di topi di controllo (E). A 6 mesi di età, tutti i neuroni della corteccia entorinale (G) e di quella parietale (H) sono AT8-positivi. Nessun neurone positivo è osservabile nella corteccia cerebrale di topi di controllo della stessa età (I). Barra di ingrandimento: 100 µm.

Figura 20. Marcatura per proteina tau A 15 mesi di età, gli anticorpi AT270 (A,B) e AT8 (C,D) marcano le cellule piramidali della regione CA1 dell'ippocampo di topi anti-NGF. Nei topi di controllo, i due anticorpi marcano solo gli assoni [AT270 (B) e AT8 (D)]. Barra di ingrandimento: 100  $\mu$ m.

Figura 21. Marcatura per proteina tau La marcatura ottenuta con mAb AT180 aumenta con l'età nei topi anti-NGF. (E) Corteccia cerebrale ad 1 mese di età, (F) a 6 mesi e a (G) 15 mesi di età. Le frecce puntano ai neuriti distrofici, le punte di freccia evidenziano cellule positive non neuronali. Barra di ingrandimento: 75  $\mu$ m.



Figura 22. Marcatura ottenuta con mAb AT270 nella corteccia cerebrale di topi anti-NGF a (A) 1 mese, (B) 1.5 mesi e (C) 2 mesi di età. Nessuna differenza e' osservabile in relazione ai topi di controllo. A partire da 6 mesi di età, nei topi anti-NGF appare una marcatura nei neuroni corticali (D). Il numero dei neuroni marcati aumenta nei topi anti-NGF di 15 mesi (E). A 6 e 15 mesi i topi di controllo non mostrano neuroni positivi nella corteccia cerebrale (F). Barra di ingrandimento: 100  $\mu$ m.

Figura 23. Atrofia muscolare. Sezioni trasversali dei muscoli prelevati da topi di controllo e topi anti-NGF. Colorazione: ematossilina eosina. M. retto mediale della coscia di un topo di controllo (A) e di un topo transgenico (B). M. gastrocnemio di un topo di controllo (C) e di un topo transgenico (D). M. tibiale anteriore di un topo di controllo (E) e di un topo transgenico (F).

Figura 24. Deposizione di amiloide nel muscolo. La colorazione con Congo Red evidenzia la presenza di depositi di amiloide nei muscoli di topi transgenici (B) rispetto a quelli di controllo (A).

Figura 25. Deposizione di amiloide nel muscolo. L'immunoreattività contro la proteina  $\beta$ -amiloide nei muscoli di topi di controllo "anziani" (A) è completamente assente. Nei topi anti-NGF (B) si assiste ad un aumento della marcatura, evidenziata dal precipitato marrone, a livello del sarcolemma e del citoplasma delle miofibre.

Figura 26. Fosforilazione della proteina tau nel muscolo. L'immunoreattività contro la proteina tau fosforilata nei muscoli di topi di controllo "anziani" (A) è completamente assente. Nei topi anti-NGF si assiste ad un aumento della marcatura, evidenziata dal precipitato marrone, a livello del sarcolemma e del citoplasma delle miofibre (B).

Figura 27. Infiltrazione di macrofagi nel muscolo. Sezioni longitudinali (A) e trasversali (B) di muscoli di topi transgenici anti-NGF "anziani". Fra le miofibre si osserva la presenza di cellule di tipo immunitario, quali i macrofagi (frecce).

Figura 28. Posizione dei nuclei nelle miofibre di topi anti-NGF. In alcune miofibre dei topi "anziani" si osserva la presenza di nuclei posti al centro della cellula (frecce), anziche' alla periferia (asterischi).

Figura 29. Test di comportamento di topi anti-NGF. A) Test nocicettivo di topi transgenici anti-NGF e di topi di controllo. B) Test «Open field». C) Test «Rotarod». D) Curve di «orientamento spaziale» per topi anti-NGF (n=10, cerchi pieni) e topi di controllo (n=10, cerchi vuoti) nel test del labirinto radiale. Le barre verticali rappresentano

l'errore standard. Il numero di entrate necessarie per trovare tutti e quattro i pasti è riportata in funzione del tempo. E) Test di mantenimento delle funzioni acquisite, effettuato a 31 giorni dalla fase di apprendimento. F) Test di trasferimento delle nozioni acquisite, effettuato il giorno dopo il test di mantenimento.

Figura 30. Test di discriminazione degli oggetti. Il test di discriminazione degli oggetti evidenzia un difetto nella distinzione degli oggetti nei topi anti-NGF. \*, P< 0.03.

Esempio 1. Produzione dei topi transgenici anti-NGF e loro caratterizzazione molecolare.

Preparazione del transgene.

L'anticorpo chimerico ricombinante è stato ottenuto per assemblaggio delle sequenze di DNA corrispondente alle regioni variabili murine dell'anticorpo monoclonale anti-NGF Mab  $\alpha$ D11 (Ruberti et al. et al., 1993) (Genbank, n° di accesso: L17077/NID g310168, catena pesante e L17078/g310169, catena leggera) con il DNA corrispondente alle regioni costanti delle catene leggere K e pesanti  $\gamma$ 1 umane. Le unità trascrizionali corrispondenti alla catena chimerica leggera e a quella pesante (figura 1A), contenenti in 5' il promotore di Cytomegalovirus ed in 3' il sito di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (bGH), clonate rispettivamente nei vettori di espressione pcDNA1-NeoVK $\alpha$ D11HuCK e pcDNA1-NeoVH $\alpha$ D11HuCy sono state estratte mediante restrizione enzimatica con gli enzimi KpnI-Apal e KpnI-XbaI rispettivamente, purificate e microiniettate separatamente o in combinazione nel pronucleo di cellule

uovo di topo del ceppo B6SJL fecondate, secondo metodiche standard descritte ad esempio in Allen et al., 1987. Sono stati ottenuti due progenitori transgenici per la catena leggera (famiglia A, basso produttore e B, alto produttore), due per quella pesante dell'anticorpo (famiglia C, alto produttore e D, basso produttore) e tre per entrambe (doppio transgenico). Questi ultimi progenitori, che esprimono l'anticorpo ad un livello di circa 50 ng/ml, non sono in grado di riprodursi e sono quindi inutilizzabili per il proseguimento delle ricerche.

L'analisi molecolare dei topi transgenici progenitori (famiglie A, B, C, D) è stata effettuata mediante PCR (Figura 1C) o Dot Blot (Figura 1 D), su DNA genomico estratto da biopsie ottenute dalla coda, come descritto in Piccioli et al., 1995. L'RNA messaggero è stato estratto secondo il metodo di Chomcynzki and Sacchi, 1987 a tempi diversi dalla nascita ed è stato analizzato mediante RNAse-protection.

#### Preparazione del topo anti-NGF.

Al fine di generare animali transgenici per l'anticorpo funzionale, composto da entrambe le catene, i due progenitori transgenici solo per la catena leggera (progenitori A e B) o solo per quella pesante (progenitori C e D) sono stati incrociati in diverse combinazioni (Figura 1B). Solo gli incroci dei progenitori A con D e dei progenitori B con C, che danno rispettivamente famiglia 1 e famiglia 2 di topi eterozigoti doppi transgenici, risultano fecondi e generano animali vitali con una efficienza superiore all'80%.

#### Caratterizzazione del topo anti-NGF.

I livelli di anticorpo funzionale o delle catene leggera o pesante degli animali transgenici sono stati misurati mediante saggio ELISA (Molnar et al., 1998), utilizzando un anticorpo secondario anti-IgG umane marcato con biotina, dopo diluizione del siero o degli omogenati di cervello (Piccioli et al., 1995) 1:10 in PBS-2% latte in polvere.

I livelli di anticorpo chimerico anti-NGF della famiglia 1 e 2, misurati nel siero e nel tessuto cerebrale di animali adulti (90 giorni), superano i 100 ng/ml ed i 100 ng/mg, rispettivamente. Nella famiglia 2 i livelli risultano essere circa doppi che nella famiglia 1. Nell'animale appena nato (1 giorno) i livelli di anticorpo sono invece inferiori al limite di detectabilità del saggio (0,1 ng/ml nel siero e 0,1 ng/mg nei tessuti) (Figura 2C).

Gli mRNA specifici per le catene VH e VK chimeriche vengono espressi in diversi tessuti tra cui il cervello, il rene, il cuore, il muscolo, il fegato ed i testicoli. I livelli di mRNA di entrambe le catene sono circa sei volte superiori nell'animale adulto (90 giorni) rispetto al neonato (1 giorno) (Figura 1 E).

Risulta quindi che l'aumento di espressione (1-2000X) dell'anticorpo funzionale anti-NGF osservato nell'animale eterozigote anti-NGF (doppio transgenico), è solo in parte dovuto all'aumento dei livelli di espressione di mRNA.

Sezioni di organo di topi anti-NGF sono quindi state fissate mediante perfusione intracardiacca di paraformaldeide 4% in PBS, raccolte su vetrino, preincubate in siero fetale 10% e BSA 5%, quindi utilizzate per evidenziare mediante immuno-istochimica l'espressione di



diversi antigeni: in particolare la co-espressione della catena leggera e di quella pesante dell'anticorpo anti-NGF sono state evidenziate mediante anti-human light o heavy chain biotinilate (Amersham), rivelate da avidina-biotina coniugata con HRP o AP (Elite Standard kits, Vector). La localizzazione a livello cerebrale è mostrata in figura 2A, in figura 2B è evidenziato, mediante immuno-istochimica, che le due catene dell'anticorpo chimerico sono frequentemente co-esprese.

**Esempio 2. Knockout fenotipico dell'NGF nel topo transgenico anti-NGF.**

La caratterizzazione del fenotipo del topo anti-NGF è stata effettuata a vari livelli: macroscopico, istologico e molecolare. A livello macroscopico, nelle prime tre-quattro settimane di vita i topi transgenici anti-NGF non mostrano anormalità di rilievo, ad esclusione di una diminuzione del peso corporeo di circa il 25% rispetto a corrispondenti topi di controllo (Figura 2 D ed E). In genere, gli esperimenti sono stati effettuati con gruppi di numerosità n=6 animali transgenici anti-NGF con livelli anticorpo anti-NGF compresi tra 50 e 300 ng/ml; come controlli sono stati utilizzati topi transgenici solo per la catena pesante (VH) dell'anticorpo (progenitori C o D), quindi non esprimono l'anticorpo funzionale.

A livello istologico e molecolare vengono osservate le seguenti differenze rispetto ai topi normali, suddivise per distretto: 1) sistema nervoso centrale e periferico, 2) apparato muscolare e 3) milza.

**1) Sistema nervoso centrale e periferico.**

Nel telencefalo basale si osserva una riduzione fino al 57% del numero di neuroni positivi per l'acetil-trasferasi (ChAT) ed una riduzione del livello di espressione, mentre fino al 70% in meno dei neuroni è osservabile nell'ippocampo. Inoltre le cellule appaiono morfologicamente più piccole. Per quanto riguarda il sistema nervoso periferico, i gangli cervicali superiori risultano fino al 45% più piccoli del controllo; anche in questo caso le cellule constituenti appaiono morfologicamente più piccole (Figura 3 A-B). L'aspetto morfologico ed istologico degli encefali di topi che esprimono l'anticorpo ricombinante anti-NGF è stato analizzato in topi transgenici con un'età compresa tra 15 e 18 mesi (animali «anziani») in combinazione con la presenza di marcatori fenotipici di malattie neurodegenerative, quali: «neuronal loss» e apoptosi, sintesi di colin-acetyltransferasi (ChAT) (Figura 3 A,B), misurata mediante immuno-istochimica con antisiero anti-ChAT (Chemicon), rapporto proteina tau fosforilata e non fosforilata (misurate mediante immuno-istochimica o western blot con antisieri specifici), presenza di proteina  $\beta$ -amiloide e del precursore della proteina amiloide APP (Amyloid Precursor Protein) fosforilata (misurati mediante immuno-istochimica con antisieri specifici). La numerosità dei gruppi utilizzati per gli esperimenti, dove non altrimenti indicata, è stata pari a n=6 transgenici anti-NGF con livelli anticorpo anti-NGF transgenico compresi tra 50 e 300 ng/ml; come controlli sono stati utilizzati topi transgenici solo per la catena pesante (VH) dell'anticorpo (progenitori C o D), quindi non esprimenti l'anticorpo funzionale.

I risultati ottenuti possono essere riassunti nei seguenti punti:

(a) Dilatazione dei ventricoli cerebrali (Figura 4). La gravità della dilatazione ventricolare si accompagna ad una marcata atrofia della corteccia cerebrale (Figura 5) e dell'ippocampo (Figura 6).

(b) Neurodegenerazione e perdita neuronale. E' possibile visualizzare cellule apoptotiche nei topi con più gravi danni a livello cerebrale, come evidenziato dalla metodica TUNEL (Figura 7).

Fenomeni apoptotici sono indice di una progressiva morte cellulare.

(c) Diminuzione della sintesi di colin-acetyltransferasi (ChAT), (Figura 3 A-B e I-L) specialmente nel telencefalo basale. In particolare non si osservano neuroni positivi per questo marcatore nel nucleo del setto mediale in nessuno degli animali analizzati. L'espressione, in rapporto a quella osservata in topi transgenici più giovani (2-3 mesi di età), è diminuita. Una inferiore espressione si osserva anche a carico dei due recettori dell'NGF TrKA (Figura 3 E-F) e p75 nel telencefalo basale (Figura 3 G-H). In particolare, la diminuzione delle cellule positive per TrKA è più consistente rispetto a quella per p75.

(d) Aumento della fosforilazione di proteina tau (Figura 8). Utilizzando anticorpi specifici contro il segmento N-terminale della proteina tau [Alz-50 (Wolozin et al., 1986)] (Figura 8A e 8B), contro la proteina tau non fosforilata [anti-Tau 1(Grundke-Iqbali et al., 1986)] (Figura 8C e 8D) e contro lo stesso epitopo della proteina tau fosforilata [mAb AT-8 (Greenberg e Davies, 1990)] (Figura 8E e 8F), è stato evidenziato mediante immuno-istochimica, un consistente aumento generalizzato della sintesi di tau ma, soprattutto della sua componente fosforilata. Gli anticorpi utilizzati marcano neuroni corticali che

presentano una morfologia alterata, rivelando la presenza di «neuropil threads», «ghosts» e «tangles». La marcatura contro la forma fosforilata di tau ha evidenziato un consistente aumento di questa proteina anche nelle cellule della microglia che vengono attivate in processi neurodegenerativi. Anticorpi contro la proteina  $\beta$ -amiloide e contro la proteina precursore dell'amiloide [APP (Glenner e Wong, 1984)] evidenziano la presenza di numerose placche sia nella corteccia paracingolare che nel neostriato (Figura 9A e 9B). In un ulteriore esperimento il progressivo aumento del contenuto di tau iperfosforilata negli encefali di topi anti-NGF è stato valutato tramite analisi biochimica (Western blot analysis). I risultati sono stati normalizzati al contenuto totale di proteina ottenuto utilizzando un anticorpo contro la tubulina (Fig. 10A). Il western blot eseguito con gli anticorpi contro tau iperfosforilata (PHF-1 e AT-8), hanno evidenziato che esiste un aumento del contenuto di tau fosforilata a partire dai 2 mesi di età e che il contenuto di tau raggiunge un plateau dopo i 6 mesi (Fig. 10B). L'analisi biochimica della proteina precursore dell'amiloide ha evidenziato che il contenuto di questa proteina aumenta a partire dai 6 mesi di età (Fig. 10C). Inoltre, a 15 mesi di età, si osservano due bande, una corrispondente a 120 kDa e l'altra a 25kDa (Fig.10C).

La presenza di aggregati insolubili della proteina tau è stata valutata in topi anti-NGF di 15 mesi. Gli encefali sono stati estratti sequenzialmente con tamponi di diversa capacità di estrazione. Gli esperimenti hanno evidenziato che, nei topi anti-NGF, la maggior parte della proteina tau iperfosforilata è insolubile (Fig. 11).



Pertanto l'alterazione a livello della proteina del citoscheletro tau precede le alterazioni osservabili a livello della proteina amiloide. Gli esperimenti inoltre evidenziano la presenza di tau insolubile, che potrebbe far parte di quella componente che forma i PHF (paired helical filaments) che costituiscono le inclusioni intracellulari ed i depositi extracellulari nel morbo di Alzheimer. I risultati evidenziano anche un alterato processamento della proteina amiloide.

La presenza di placche di amiloide è stata evidenziata utilizzando un anticorpo contro la proteina precursore dell' amiloide. Gli esperimenti sono stati effettuati sia usando tecniche di immunoistochimica che di Western blot (si veda sopra). I risultati hanno evidenziato che, a quindici mesi di età, placche di amiloide sono presenti sia nella corteccia cerebrale che nell'ippocampo di topi anti-NGF (Fig.12). Queste placche occupano una parte significativa della superficie della corteccia entorinale con un valore pari al 21% della superficie rispetto ad una percentuale pari a 0.5% negli topi di controllo. In altre regioni della corteccia cerebrale la percentuale di superficie occupata da placche di amiloide è pari al 10% nei topi anti-NGF, mentre è uguale al 0.1% nei topi di controllo. Nell'ippocampo dei topi anti-NGF la percentuale è uguale al 4%, mentre è pari al 0.1% nei topi di controllo.

La distribuzione delle placche, e la loro morfologia, nei topi anti-NGF è del tutto paragonabile con quelle osservate in sezioni di cervello di pazienti Alzheimer (Fig. 13). Da questi dati si conclude che nei topi anti-NGF si osserva una elevata deposizione extracellulare di amiloide

in formazioni a placca simili, nella morfologia e nella distribuzione, a quelle osservate in sezioni di cervello umano i soggetti colpiti dal morbo di Alzheimer.

(e) Presenza di inclusioni intracellulari (tangles) in neuroni di topi anti-NGF. La presenza di inclusioni intracellulari (tangles) in sezioni di encefalo di topi anti-NGF è stata evidenziata utilizzando un anticorpo, mAb NFT200, che è in grado di evidenziare tangles in sezioni da encefalo di pazienti colpiti da Alzheimer. MAb NFT200 ha marcato molti neuroni distribuiti in tutto l'encefalo di topi anti-NGF (Fig. 14a-c), ma non in animali di controllo Fig. 14d. L'anticorpo ha evidenziato la presenza di inclusioni intracellulari anche in neuriti distrofici. Il paragone fra la distribuzione delle tangles in topi anti-NGF e quella osservabile in sezioni cervello di pazienti Alzheimer è visibile nella figura 15.

L'anticorpo MAb NFT200 evidenzia, nell'encefalo di topi anti-NGF, delle formazioni simili a quelle osservate in sezioni di cervello umano. Questa caratteristica, indispensabile nell'uomo per avere una conferma della diagnosi di malattia di Alzheimer, non era mai stata evidenziata prima in altri modelli animali tendenti a riprodurre parzialmente questa patologia.

(f) Alterazioni della distribuzione della proteina associata ai microtubuli MAP-2. La proteina associata ai microtubuli (MAP-2) fa parte di quel complesso di proteine che formano il citoscheletro dei neuroni. Le alterazioni a livello di questa proteina sono state messe in evidenza usando l'anticorpo anti-MAP-2. A 1 e 1.5 mesi di età la distribuzione della proteina MAP-2 nei neuroni della corteccia nei topi

transgenici anti-NGF è simile a quella osservata nei topi di controllo della stessa età. A 2 mesi di età, nei topi di controllo la marcatura per MAP-2 è distribuita per tutta la lunghezza dei dendriti (Fig. 16A). A questa età, nei topi anti-NGF si osserva una diminuzione del numero dei dendriti marcati e una ridistribuzione della marcatura lungo i dendriti

---

(Fig. 16B). A 6 e 15 mesi di età, il numero dei dendriti continua a diminuire nei topi anti-NGF. Nei dendriti di questi animali si osserva anche un'evidente ridistribuzione della marcatura, che appare localizzata nella parte prossimale dei dendriti. (Fig. 16D,F). Nei topi di controllo di età corrispondente la marcatura per MAP-2 rimane distribuita per tutta la lunghezza del dendrita (Fig. 16C,E).

Da questi risultati si può dedurre che la depravazione da NGF determina un'alterazione della distribuzione delle proteine del citoscheletro dei neuroni corticali. Questa alterazione potrebbe far parte di quei fenomeni neurodegenerativi che portano all'instaurarsi della malattia di Alzheimer.

(g) Impregnazione argentica di encefali di topi anti-NGF. per questi esperimenti e' stata utilizzata una tecnica di impregnazione argentica (metodo di Bielschowsky) precedentemente utilizzata per evidenziare placche neuritiche extracellulare e tangles in sezioni di encefalo di pazienti Alzheimer.

Nei topi anti-NGF questa tecnica ha consentito di evidenziare la co-esistenza di neuriti distrofici e di materiale fibroso extracellulare raggruppato sotto forma di placche (Fig. 17E,F). Queste formazioni sono evidenti in topi di 6 e 15 mesi di età.

L'impregnazione argentica è una tecnica istologica che ha consentito di evidenziare la presenza di placche di materiale depositato extracellularmente e di neuriti distrofici in modo indipendente dalle tecniche immunoistochimiche. Inoltre, questa tecnica ha permesso di evidenziare la co-esistenza di queste due alterazioni. I tentativi di evidenziare queste alterazioni in altri modelli animali per la malattia di Alzheimer sono falliti.

(h) Progressione temporale della neuropatologia in topi anti-NGF. Sono stati eseguiti esperimenti per valutare l'insorgenza di alterazioni nei diversi markers fenotipici. Questa progressione temporale è riassunta di seguito e nella tabella 2:

1. La diminuzione di neuroni positivi per la colin-acetyltransferasi (ChAT), evidenziata precedentemente (Ruberti et al., 2000), continua dopo i 2 mesi di età e raggiunge un plateau a 6 mesi di età, dove si osserva una riduzione del numero di neuroni positivi nel nucleo del setto mediale pari al 90% (Fig. 18C,D).

2. La determinazione della distribuzione somatodendritica della proteina tau nel suo stato iperfosforilato è stata eseguita con diversi anticorpi e, nei topi anti-NGF, ha evidenziato che:

- a 2 mesi di età solo la corteccia entorinale presenta alterazioni evidenziate con mAb AT8 (Fig. 19),
- queste alterazioni si estendono ad altre regioni della corteccia cerebrale e all'ippocampo (Fig 19 e Fig. 20) a partire da 6 mesi di età,
- queste alterazioni sono evidenziate anche da altri anticorpi, diversi da AT8, cioè da mAbs AT180 e AT270.



3. L'anticorpo AT8, utilizzato in associazione a tecniche di estrazione, evidenzia che la maggior parte della proteina tau estratta dagli encefali di topi anti-NGF e' di tipo insolubile.

4. Le alterazioni citoscheletriche non sono solo a livello della proteina tau ma anche a livello della proteina MAP-2 ed incominciano a 2 mesi di età.

5. Le inclusioni tangle-like sono presenti solo a 15 mesi di età, mentre i neuriti distrofici vengono evidenziati già a partire da 6 mesi.

6. La frammentazione di DNA si osserva solo a 15 mesi di età.

In conclusione i topi anti-NGF presentano una progressione temporale della neurodegenerazione che parte dal deficit colinergico e dalle alterazioni a livello di alcune proteine del citoscheletro. La progressione spaziale della patologia è simile a quanto osservato in encefali da pazienti Alzheimer.

### Segue tabella 2

SOPA

Tabella 2

MARCATORI FENOTIPICI	ZONE CEREBRALI	ETA' (MESI)				
		1	1.5	2	6	15
Riduzione di ChAT		-	-	+	++	++
Presenza di tau iperfosforilata nel compartimento somatodendritico						
AT180	Corteccia entorinale	-	-	-	+	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-			
AT270	Corteccia entorinale	-	-	-	+	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	-	+
AT8	Corteccia entorinale	-	-	+	++	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	+	++
Tau insolubile		ND	ND	ND	ND	++
Localizzazione subcellulare anormale di MAP-2		-	-	+	++	++
Tangles neurofibrillari		-	-	-	-	++
Placche amiloidi		-	-	-	+	++
Inclusioni rivelate per Impregnazione argentica		-	-	-	+	++
Neuriti distrofici*	Corteccia entorinale	-	-	-	++	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	-	-
Frammentazione del DNA	Corteccia cerebrale	-	-	-	-	+
	Proencefalo basale	-	-	-	-	-

Il simbolo + indica una misura qualitativa di ciascun marcatore fenotipico. ND, non effettuato.

\* Come rivelato da impregnazione argentica e immunoistochimica con anticorpi anti-tau iperfosforilata e "tangles".

Pertanto l'analisi di questi topi ha evidenziato come la patologia neurodegenerativa a livello di encefalo sia preceduta da una precoce (a 2 mesi) iperfosforilazione di tau e deposizione di amiloide nel muscolo scheletrico del dorso e degli arti inferiori. Il muscolo scheletrico potrebbe pertanto essere utilizzato come elemento di diagnosi precoce della malattia neurodegenerativa nell'uomo. E' da ricordare che è già noto che, nell'uomo, il morbo di Alzheimer è associato ad una miosite a corpi inclusi (Inclusion Body Myositis).

In conclusione, i topi transgenici che esprimono l'anticorpo anti-NGF ricapitolano a livello del Sistema Nervoso Centrale e Periferico molte delle alterazioni patologiche tipiche di malattie neurodegenerative, in particolare della malattia di Alzheimer.

## 2) Apparato muscolare.

I topi analizzati (n=15) di età compresa tra i 45 e 60 giorni, mostrano a livello macroscopico un'andatura ondeggiante, dovuta ad una anormale posizione delle zampe posteriori e all'appoggio sulla punta delle dita, e sviluppano spesso scoliosi della colonna vertebrale.

L'analisi anatomica mostra una riduzione dei muscoli scheletrici longitudinali della schiena, dei flessori e degli adduttori delle zampe posteriori, caratteristica non osservabile in altri muscoli, per esempio dei corrispondenti muscoli delle zampe anteriori. Alcuni deficit sono stati meglio caratterizzati e sono descritti nei seguenti punti in dettaglio:

a) distrofia muscolare, caratterizzata dal punto di vista morfologico ed istologico. L'atrofia delle fibre muscolari è presente, in tutti gli animali analizzati (n= 15), a livello dei muscoli che consentono i movimenti della colonna vertebrale e coadiuvano la stabilità delle connessioni fra vertebra e vertebra (m. lunghissimo del dorso e mm. intervertebrali, rispettivamente). Inoltre, in tutti gli animali, la riduzione del diametro delle fibre muscolari (fino al 50%) è osservabile nel 70% delle fibre: nei muscoli adduttori (m. retto mediale della coscia, mm. grande e piccolo adduttore), nei muscoli flessori della coscia (mm. ischiotibiali esterno, medio e interno) ed estensori del metatarso (m. gastrocnemio e m. soleo). L'atrofia non è invece presente a livello dei

muscoli flessori del metatarso (m. tibiale anteriore e mm. estensori delle falangi), ed è molto meno evidente nei muscoli estensori degli arti anteriori (m. tricipite brachiale). Tutte queste differenze vengono mostrate nella Figura 23. Inoltre tutte le fibre muscolari colpite da atrofia presentano anche una marcata vacuolizzazione (Figura 23 B-E) e una più intensa colorazione per l'ematossilina/eosina.

b) scoliosi, presente in alcuni animali (n<6), associata in alcuni casi con uno sviluppo incompleto dei corpi vertebrali.

c) atrofia muscolare, tipizzata a livello molecolare come segue:

c.1) riespressione del recettore per l'NGF a bassa affinità (p75).

E' particolarmente evidente in alcune cellule muscolari che presentano alterazioni nella distribuzione dei recettori nicotinici a livello delle giunzioni neuromuscolari.

c.2) diminuzione del numero delle terminazioni nervose peptidergiche a livello di giunzioni neuromuscolari. Questa diminuzione è stata evidenziata con anticorpi contro il peptide "calcitonin gene-related peptide" [CGRP (Gibson et al., 1984)].

c.3) assenza dell'aggregazione dei recettori per l'acetilcolina presenti nella membrana plasmatica delle cellule muscolari ed evidenziati dal legame irreversibile della alfa-bungarotossina (Changeux, 1991), dovuta ad una mancata innervazione della fibra muscolare. La distribuzione delle cellule muscolari che presentano questa alterazione conferisce ai muscoli dei topi transgenici un caratteristico "pattern" a mosaico.



c.4) aumento dell'immunoreattività per la distrofina, evidenziabile nelle stesse cellule che presentano le alterazioni molecolari sopra descritte, mediante immuno-istochimica con l'anticorpo D-8043 (Sigma). La distrofina è una proteina del citoscheletro della cellula muscolare coinvolta nella contrazione e nell'aggregazione dei recettori colinergici. E' noto che un aumento della sintesi di distrofina avviene in coincidenza con la denervazione del muscolo.

c.5) alterato metabolismo dell'ATPasi dovuto al mancato effetto trofico da parte del nervo.

c.6) marcata deposizione di sostanza amiloide, evidenziata da una caratteristica marcatura citoplasmatica ad anello con Congo Red (Figura 24 A-B). La presenza di amiloidi, ed in particolare di  $\beta$ -amiloidi, è stata evidenziata anche tramite immuno-istochimica contro la proteina precursore della  $\beta$ -amiloidi (Figura 25 A-B) in topi anziani.

c.7) proteina tau fosforilata nei muscoli dei topi anziani (di età compresa tra 15 e 18 mesi) Figura 26 A-B.

c.8) presenza di numerose fibre muscolari con nuclei localizzati in posizione centrale anziché al di sotto del sarcolemma in topi anti-NGF «anziani» (Figura 28). L'istologia mette in evidenza una infiltrazione di cellule di origine immunitaria, probabilmente macrofagi, fra le fibre muscolari (Figura 27 A-B).

La presenza di depositi di  $\beta$ -amiloidi e di proteina tau iperfosforilata ed inoltre dei nuclei posti in posizione centrale e della infiltrazione macrofagica, correla con quanto osservato nella miosite a

corpi inclusi (inclusion body myositis, IBM), patologia strettamente in relazione con la malattia di Alzheimer.

### 3) Milza.

A livello anatomico la localizzazione dell'innervazione simpatica è sparsa nel centro germinale e nella zona marginale, anziché nelle vicinanze dell'arteria centrale, come nei topi di controllo. Il recupero degli splenociti vitali è ridotto di circa un ordine di grandezza ( $2-3 \times 10^6$  vs.  $2-3 \times 10^7$  dei controlli) nei topi transgenici anti-NGF, come osservato mediante citometria a flusso. Funzionalmente si può osservare una riduzione del numero di linfociti IgG positivi ed un discreto aumento di linfociti IgD positivi, come misurato dopo incubazione (30', 4°C) degli splenociti con anticorpi primari marcati con FITC anti-IgG (Sigma), IgM, IgA, IgD di topo (Pharmingen) ed analisi con Coulter Epics Elite Esp Flow Cytometer a 488 nm. Inoltre, nella polpa rossa può essere evidenziata frammentazione del DNA, che indica apoptosi in accordo con il ridotto recupero di splenociti vitali.

### Esempio 3. Analisi del comportamento di topi transgenici anti-NGF.

E' stata effettuata su animali (n=6) di età compresa tra 12 e 18 mesi, selezionando animali senza evidenti anomalie di andatura. Sono state riscontrate le seguenti anomalie rispetto agli animali di controllo riassunte in Figura 29:

- aumento del tempo di latenza per la sensibilità al calore, che passa da 3" nei topi di controllo a 16" nei topi anti-NGF, misurato secondo il saggio nocicettivo della "piastra calda", come descritto in Eddy et al., 1953;

- orientamento spaziale: i topi anti-NGF compiono un numero più alto di errori durante la fase di apprendimento nei primi tre giorni (working memory learning), le due curve di apprendimento differiscono infatti in modo significativo (test di RMANOVA a due vie,  $p<0,05$ ) tuttavia il livello finale di apprendimento non differisce da quello dei topi

---

di controllo, come misurato nel test del «labirinto radiale», effettuato come segue: gli animali furono posti in labirinto radiale ad 8 braccia e lasciati liberi di nutrirsi per 5' e di familiarizzare con il labirinto per due giorni (pre-training). Per la prova, le stesse quattro braccia furono riempite di cibo ogni giorno: all'inizio di ogni prova, i topi furono lasciati al centro del labirinto, liberi di esplorarlo: il test fu fatto terminare a cibo terminato, o quando furono rilevate 25 entrate nelle braccia del labirinto: le prove furono ripetute due volte al giorno per 14 giorni, misurando gli errori commessi (errori di memoria a breve e lungo termine) ed il tempo utilizzato. Il livello iniziale e finale di apprendimento fu misurato dal numero medio di errori commessi nei primi tre giorni e negli ultimi tre.

- capacità di mantenimento delle nozioni acquisite. I topi anti-NGF non mantengono le nozioni acquisite a 31 giorni dalla fase di apprendimento, come misurato nello stesso test del «labirinto radiale». Le curve di apprendimento furono comparate con il test di ANOVA a due vie (trattamento x tempo), e la significatività delle differenze verificata mediante T-test.

- deficit della capacità di trasferimento dell'insegnamento ad un'altra situazione, come misurato mediante test del «labirinto radiale», utilizzando uscite riempite di cibo diverse da quelle utilizzate durante la

fase di apprendimento. I topi anti-NGF mostrano un chiaro deficit di apprendimento ( $p < 0,01$  in test di RMANOVA a due vie) rispetto ai controlli, anche dopo 5 giorni di apprendimento. Le differenze sono dovute principalmente ad un numero più alto di errori di memoria a breve termine (T-test,  $p < 0,006$ ).

- test di memoria a breve termine (test di discriminazione degli oggetti): Per questo test, i topi hanno esplorato 2 cubi bianchi per 10 min. Quindi, uno dei cubi è stato rivestito con carta a scacchi bianchi e neri. Dopo un'ora dalla conclusione del primo trial, i topi sono stati rimessi in contatto con i cubi e gli è stato consentito di esplorarli per ulteriori 10 min. I topi transgenici anti-NGF non sono stati in grado di distinguere fra i due cubi rivestiti con carta di colore diverso (Fig. 30). Pertanto, i topi anti-NGF mostrano una diminuzione della memoria a breve termine, non essendo in grado di memorizzare e di distinguere i due cubi di colore diverso.

Esempio 4. Reversibilità della distrofia muscolare in topi anti-NGF mediante somministrazione locale di NGF.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in topi a partire dal 45 giorno di età, quando il tasso dell'anticorpo anti-NGF nel siero sta per raggiungere il livello massimo (osservato a 60 giorni). L'NGF è stato somministrato localmente con metodi diversi: (a) per iniezione intramuscolare di NGF, (b) per mezzo di un vettore virale ricombinante (adenovirus) codificante per il cDNA dell'NGF o (c) l'impianto di fibroblasti che secernono NGF. Tutte le vie di somministrazione hanno previsto l'iniezione o l'impianto nel muscolo gastrocnemio, uno dei



muscoli scheletrici colpiti da distrofia muscolare. Le iniezioni e gli impianti sono stati effettuati nella zampa destra, mentre il muscolo gastrocnemio della zampa sinistra è stato utilizzato come controllo. a) L'NGF è stato iniettato sotto forma di pellet, costituito da NGF miscelato a diazocellulosa in tampone borato a pH 8.0 per 72 ore e da una successiva neutralizzazione con glicina ad una concentrazione saturante (Hendry, 1982). Questo metodo consente la precisa localizzazione ed il rilascio lento di questa neurotrofina. Sono state utilizzate diverse concentrazioni di NGF comprese in un range fra i 100 µg e 2 mg per animale. Per la somministrazione di cDNA secondo il metodo b), 10 µl di una soluzione del vettore adenovirale pari a  $10^7$  pfu/ml sono stati iniettati nel muscolo gastrocnemio. Negli animali di controllo è stato iniettato un adenovirus ricombinante contenente il gene reporter Lac Z di Escherichia coli. Sia in questo caso che in quello dell'impianto di fibroblasti (vedi dopo), la produzione di NGF è stata costante per almeno 1 mese, consentendo l'osservazione di una reversibilità del fenotipo.

Secondo il metodo c) sono stati impiantati nel muscolo, fibroblasti modificati geneticamente per secernere NGF tramite l'infezione con un vettore retrovirale codificante per il cDNA di questa neurotrofina, secondo il metodo descritto da Gage et al. (1990). Questo ha consentito di raggiungere una produzione in situ di NGF pari a 100 ng/ $10^6$  cellule/giorno. I fibroblasti sono stati iniettati dopo risospensione in soluzione fisiologica sterile alla concentrazione pari a  $2 \times 10^5$  cellule/µl. Il volume di iniezione è stato pari a 10 µl/animale.

Per verificare l'effetto della somministrazione di NGF, gli animali sono stati sacrificati dopo 7, 15 e 30 giorni dal momento dell'iniezione. Il muscolo iniettato e quello controlaterale sono stati prelevati e analizzati con tecniche istologiche ed immunoistochimiche per verificare l'attenuazione della distrofia e il ristabilirsi della normale innervazione.

---

Si è potuto constatare che, in tutti gli animali iniettati, il diametro delle fibre muscolari è ritornato a valori simili a quelli degli animali di controllo. Inoltre, la loro morfologia e l'innervazione colinergica e peptidergica ha assunto un aspetto normale.

Per quanto riguarda il ristabilirsi del fenotipo colinergico nel telencefalo basale, sono stati utilizzati due differenti approcci. In una prima serie di esperimenti, è stato utilizzato, dopo anestesia, l'impianto di minipompe che rilasciano NGF. Un capillare in gomma è stato inserito nel ventricolo laterale e quindi collegato con una minipompa osmotica collocata in una «tasca» dello strato sottocutaneo. Questa pompa è stata riempita con NGF (30 - 100 µg) diluito nella soluzione fisiologica di Ringer-Locke. Un altro gruppo di animali è stato trattato con un impianto di fibroblasti modificati geneticamente per la secrezione di NGF. I fibroblasti sono stati iniettati nel ventricolo laterale alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/µl. Il volume di iniezione è stato pari a 1.5 µl/animale. Questo secondo metodo ha consentito di verificare, tramite E.L.I.S.A., una produzione di NGF costante per 4 settimane dopo l'impianto. L'analisi della espressione di colinacetiltransferasi (ChAT) nei nuclei del telencefalo basale e l'analisi del comportamento

di questi topi ha permesso di osservare la reversibilità del fenotipo osservato nei topi anti-NGF a livello del sistema colinergico.

Nell'insieme questi risultati confermano che la somministrazione di NGF è in grado di correggere il deficit muscolare e colinergico osservati nei topi anti-NGF.

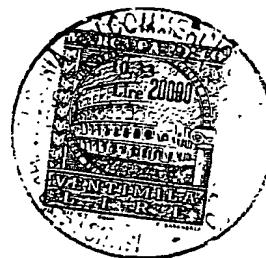
#### BIBLIOGRAFIA

- Allen, ND, et al. (1987) In *Mammalian development: A practical approach*, M. Monk, ed . (Washington DC: IRL Press) pp 217-234.
- Baron P, et al. (1994). *Muscle and Nerve* 17: 276-284.
- Boissiere F, et al. (1997). *Exp Neurol* 145: 245-252.
- Borchelt DR, et al. (1997). *Neuron* 19:939-945.
- Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999). *Am J Pathol* 154:255-270.
- Changeux JP, Duclert A, Sekine S (1992). *NY Acad Sci* 657:361-378.
- Chomcynski, P, and Sacchi, N (1987). *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Citron M, et al. (1997). *Nat Med* 3: 67-72.
- Connor B, Dragunow M (1998) *Brain Res Rev* 27: 1-39.
- Crowley, C, et al. (1994). *Cell* 76:1001-1011
- Davies AM (1992). In *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*, S. Scott, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp 194-214.
- Eddy, NB, and Leimbach, D (1953) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107: 385-396.

- Eide F, Lowenstein DH and Reichardt LF (1993) *Exp. Neurol.* 121: 200-214.
- Fukuchi K, et al. (1998) *Am J Pathol* 153: 1687-1693.
- Gage, FH, et al. (1990). *Prog Brain Res* 86: 205-217
- Games D, et al. (1995). *Nature* 373: 523-527.

---

- Gibson SJ, et al. (1984). *J Neurosci* 4: 3101-3111.
- Glenner GC, Wong CW (1984). *Biophys Biochem Res Commun* 120: 885-890.
- Goedert M (1993). *Trends Neurosci* 16: 460-465.
- Gotz J, et al. (1995). *EMBO J* 14: 1304-1313.
- Greenberg SG, Davies P (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5827-5831.
- Grundke-Iqbali I, et al. (1986). *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913-4917.
- Holcomb L, et al. (1998). *Nat Med* 4:97-100.
- Hsiao K, et al. (1996). *Science* 274: 99-102.
- Irizarry MC, et al. (1997b). *J Neurosci* 17: 7053-7059.
- Jin LW, et al. (1998). *Am J Pathol* 153: 1679-1686.
- Kalaria RN (1993). *Brain Pathol* 3: 333-347.
- Levi-Montalcini R and Booker B (1960). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:384-391.
- Luxenberg JS, et al. (1987). *Neurology* 37: 1135-1140.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (1993). *Trends Biochem Sci* 18: 480-483.
- Mizutani T, et al. (1990) *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 575-580.



- Molnar, M., et al. (1998). Eur. J. Neurosci. 10: 3127-3140.
- Piccioli, P., et al. (1995). Neuron 15:373-384.
- Ruberti, F., Bradbury, A., and Cattaneo, A. (1993). Cell. Mol. Neurobiol. 13:559-568.
- Schnell L, et al. (1994). Nature 367: 170-173.
- Selkoe DJ (1994). Curr Opin Neurobiol 4: 708-716.
- Snider WD and Johnson EM Jr (1989). Ann. Neurol. 26: 489-506.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. (1997). Proc Natl Acad Sci USA 94: 13287-13292.
- Wolozin BL, et al. (1986). Science 232: 648-650.
- Wong TP, et al. (1999). J Neurosci 19:2706-2716.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'ord. 820 B)

olga capasso



RM 2000 A 000306

## RIVENDICAZIONI

1. Animale mammifero non umano transgenico per un anticorpo anti-NGF (NGF: Nerve Growth Factor).
2. Animale secondo la rivendicazione 1 in cui l'anticorpo anti-NGF blocca il legame dell'NGF ai suoi recettori.

---

3. Animale secondo la rivendicazione 1 che esprime l'anticorpo anti-NGF solo nell'età adulta.
4. Animale transgenico secondo la rivendicazione 3 che esprime l'anticorpo anti-NGF a livelli misurabili nel siero compresi tra 50 e 500 ng/ml.
5. Animale secondo la rivendicazione 1 dove l'anticorpo anti-NGF e' il monoclonale  $\alpha$ D11.
6. Animale secondo la rivendicazione 5 dove l'anticorpo  $\alpha$ D11 e' chimerico.
7. Animale secondo la rivendicazione 6 dove l'anticorpo chimerico e' umanizzato.
8. Animale secondo la rivendicazione 1 appartenente al genere murino.
9. Animale secondo la rivendicazione 8 appartenente alla razza BS6JL.
10. Animale transgenico secondo la rivendicazione 1 che esprime almeno una delle patologie comprese nel seguente gruppo:
  - sindromi neuro-degenerative
  - atrofia/distrofia muscolare
  - alterazione delle sottopopolazioni linfocitarie e morte cellulare nella milza
11. Animale transgenico secondo la rivendicazione 10 in cui la sindrome neurodegenerativa presenta almeno uno dei marcatori

anatomici, o istologici, o molecolari, o fenotipici compresi nel seguente gruppo:

- dilatazione dei ventricoli cerebrali
- atrofia della corteccia cerebrale e/o totale scomparsa dell'ippocampo,
- perdita e/o apoptosi neuronale,
- deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel SNC,
- deficit cognitivi caratterizzati da perdita della memoria a lungo/breve termine,
- iperfosforilazione della proteina tau,
- patologia neurofibrillare.

12. Animale secondo la rivendicazione 11 dove almeno uno dei marcatori anatomici o istologici compresi nel seguente gruppo:

- dilatazione dei ventricoli cerebrali
- atrofia della corteccia cerebrale
- perdita neuronale

sono presenti ad un livello superiore a quello degli animali utilizzati come controllo.

13. Animale transgenico secondo la rivendicazione 10 in cui l'atrofia/distrofia muscolare è accompagnata a livello muscolare, da almeno uno dei marcatori anatomico o istologico o molecolari o fenotipici compresi nel seguente gruppo:

- deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide,
- iperfosforilazione della proteina tau,
- infiltrazione di cellule infiammatorie.

14. Animale transgenico secondo la rivendicazione 13 in cui la comparsa di una iperfosforilazione di tau e/o deposizione di amiloide nel

muscolo scheletrico del dorso e/o degli arti inferiori è precoce rispetto alla comparsa di marcatori neurologici.

15. Metodo di monitoraggio della comparsa di una iperfosforilazione di tau e/o deposizione di amiloide nel muscolo scheletrico del dorso e/o degli arti inferiori di un soggetto per una diagnosi precoce di malattie neurodegenerative.

16. Cellule derivate dall'animale transgenico secondo la rivendicazione 1.

17. Uso delle cellule secondo la rivendicazione 16 per la selezione di molecole attive nelle patologie neurodegenerative.

18. Uso delle cellule secondo la rivendicazione 16 per la selezione di molecole attive nelle patologie muscolari.

19. Metodo per la preparazione di un animale transgenico non umano secondo la rivendicazione 1 che comprende essenzialmente le fasi di:

a) preparazione di una linea progenitrice animale non umana, transgenica per la catena leggera dell'anticorpo monoclonale anti-NGF e di una linea progenitrice animale non umana, transgenica per la catena pesante dell'anticorpo anti-NGF,

b) incrocio delle due linee animali transgeniche progenitrici

c) selezione della prole.

20. Metodo secondo la rivendicazione 19 dove la fase a) consiste essenzialmente nell'introduzione dell'unità trascrizionale contenente il transgene codificante per la catena leggera dell'anticorpo anti-NGF e dell'unità trascrizionale contenente il transgene codificante per la catena pesante dell'anticorpo anti-NGF, separatamente, in diversi oociti



fecondati e nella selezione di progenitori transgenici per uno o per l'altro transgene.

21. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle patologie legate ad un deficit di NGF.

22. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 21 dove tale deficit è dovuto alla presenza di auto-anticorpi anti-NGF.

23. Uso dell'animale transgenico la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle sindromi neurodegenerative.

24. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 23 dove la sindrome neurodegenerativa è la malattia di Alzheimer.

25. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle patologie dell'apparato muscolare.

26. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 per la selezione di sostanze efficaci nella cura di patologie comprese nel seguente gruppo:

- sindromi neurodegenerative
- atrofia/distrofia muscolare

27. Uso dell'animale transgenico della rivendicazione 26 dove la sindrome neurodegenerativa è la malattia di Alzheimer.

28. Uso dell'NGF (Nerve Growth Factor), o di suoi frammenti peptidici, per la preparazione di composizioni farmaceutiche per il trattamento di patologie muscolari.

29. Uso dell'NGF secondo la rivendicazione 28 dove l'NGF viene fornito in una delle seguenti forme:

- NGF naturale
- NGF ricombinante

- NGF sintetico
- NGF secreto da impianto di cellule geneticamente ingegnerizzate
- NGF codificato da vettori virali.

30. Uso dell'NGF secondo la rivendicazione 29 dove tale trattamento avviene per somministrazione locale.

31. Composizioni farmaceutiche comprendenti NGF (Nerve Growth Factor) per la terapia delle patologie muscolari.

Roma, ~ 5/01/2000

p.p.: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'iscr. 820 B)  
olga capasso

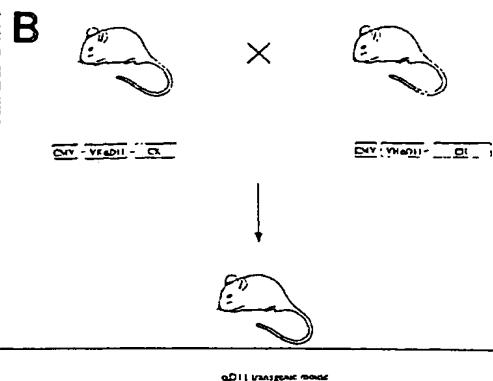
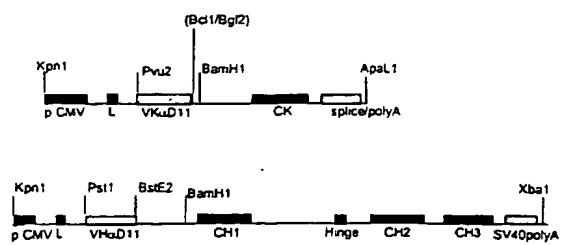
OC



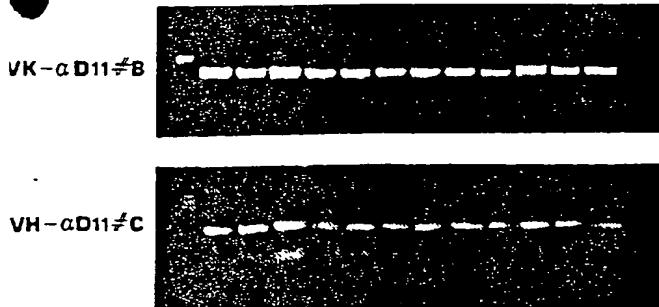
BM2000 A 000306

1/32

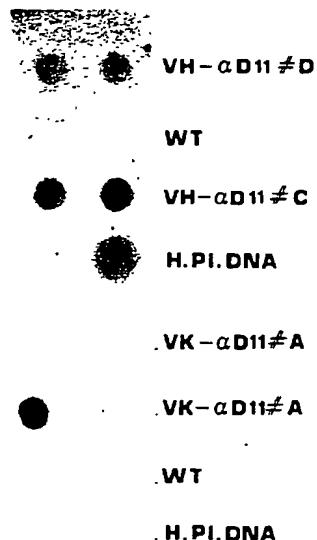
A



C



D



6

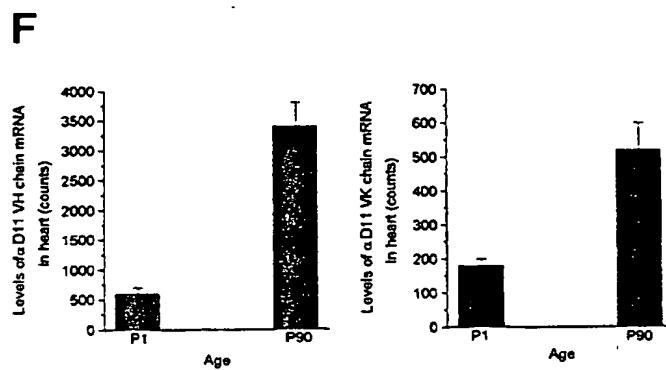
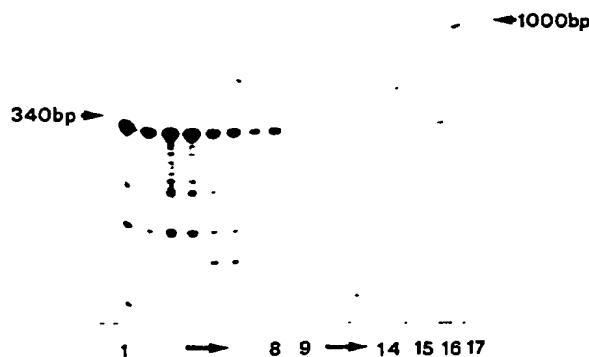


FIG. 1

D.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.D.A. UN MANDAT

*dei capi passati* **UN MANDATARIO**  
per se e per gli altri  
**Olga Capasso**  
(N° d'iscr. 820 B)



2/32

RM2000 A 000306

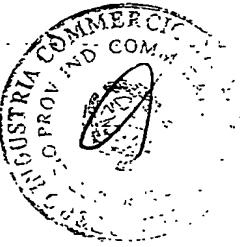
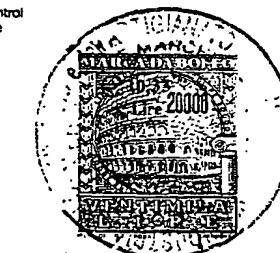
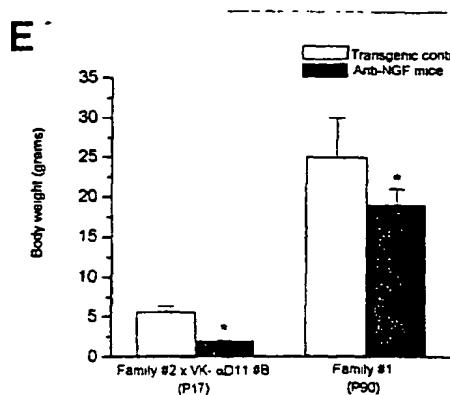
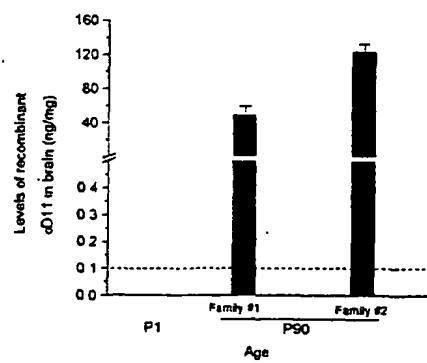
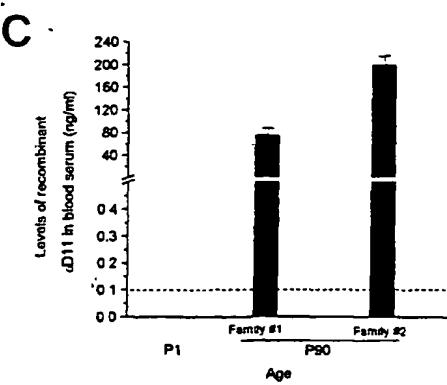
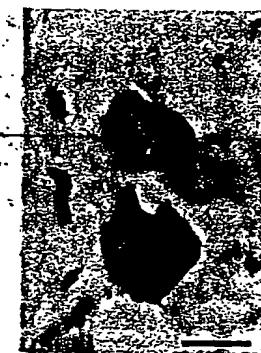
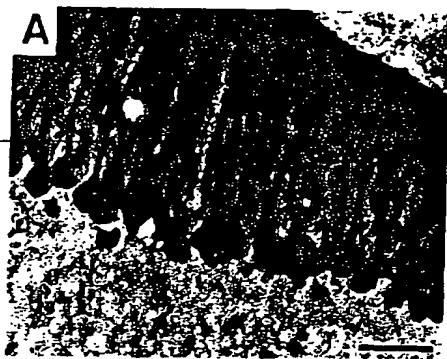


FIG. 2

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
degli ex paesi  
Sergio Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

3/32 RM2000 A 000306

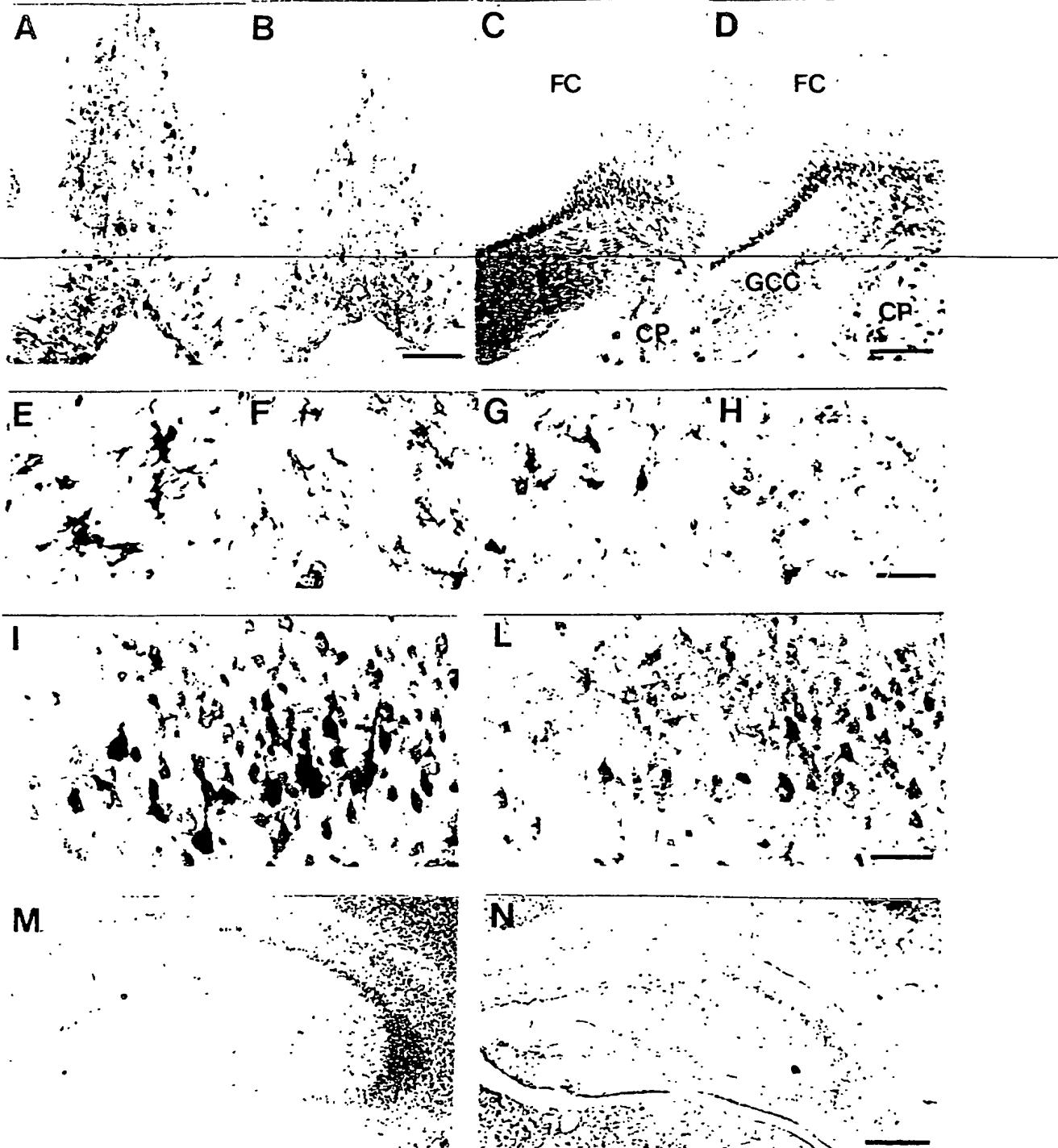


FIG. 3

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*daga capasso*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



4/32

RM2000 A 000306

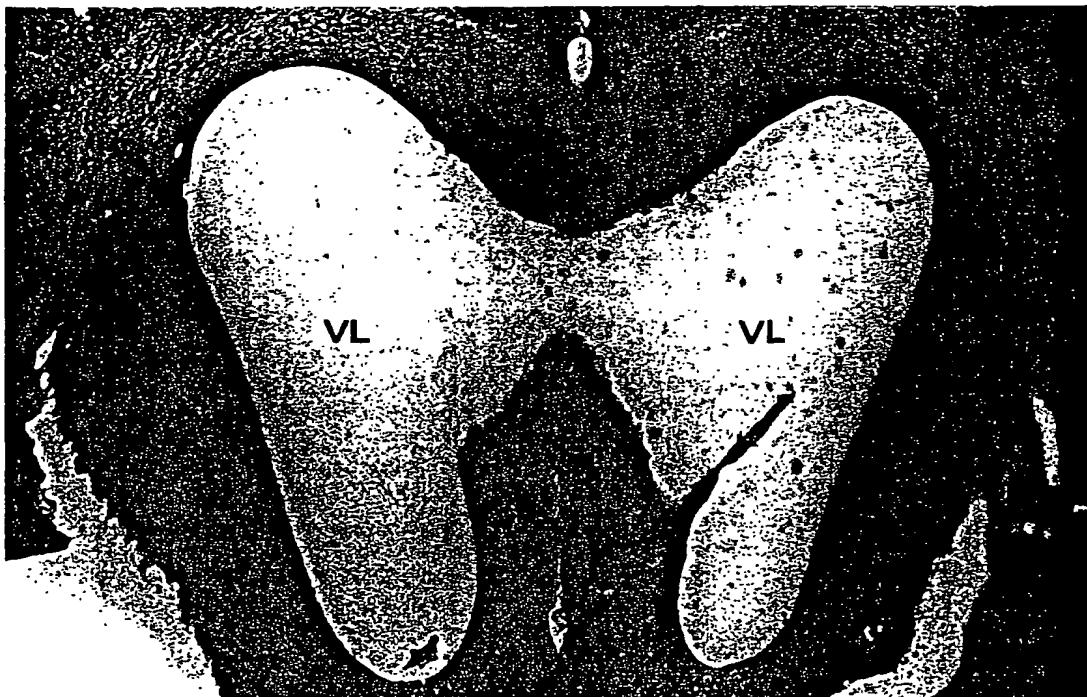
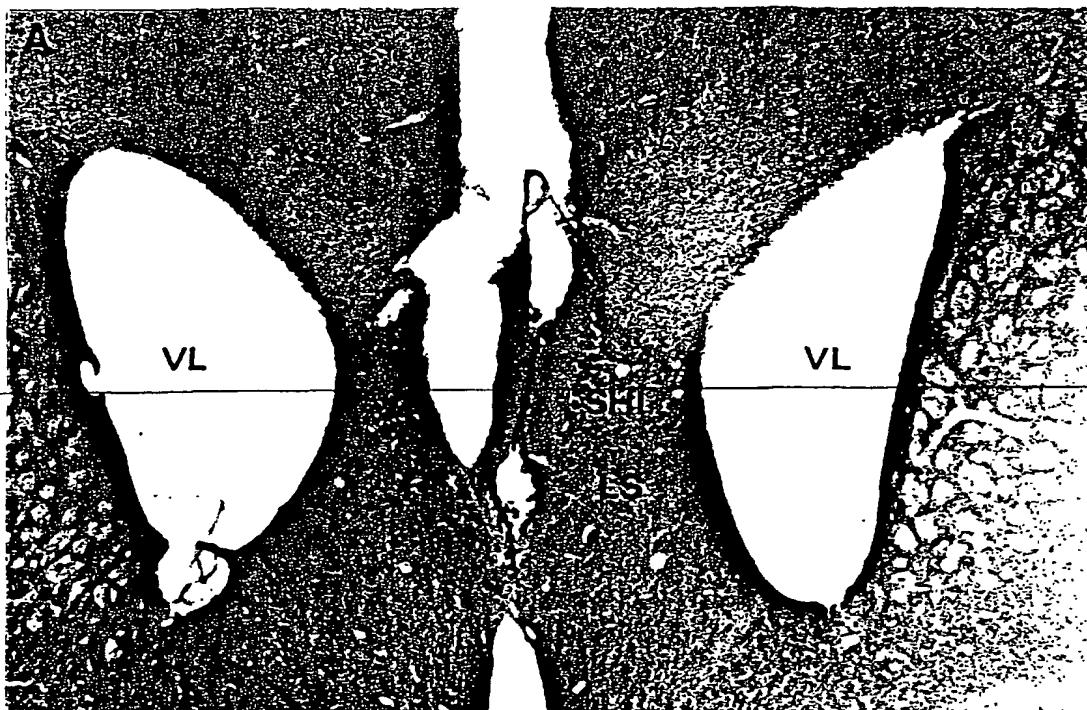


FIG. 4

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

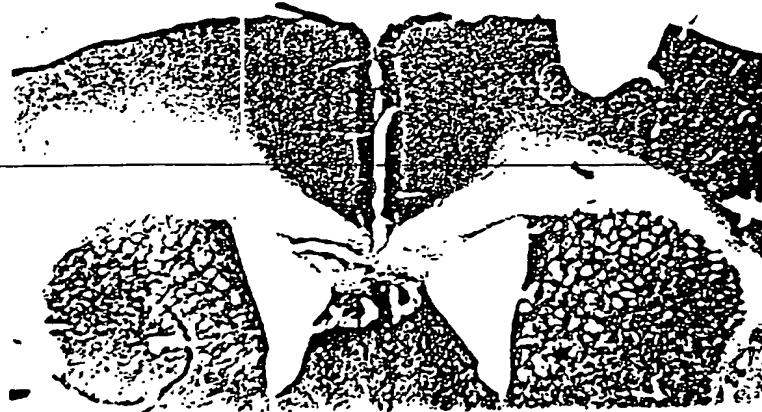
*dopo la passione*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



5/32

RM2000 A 000306

A



B

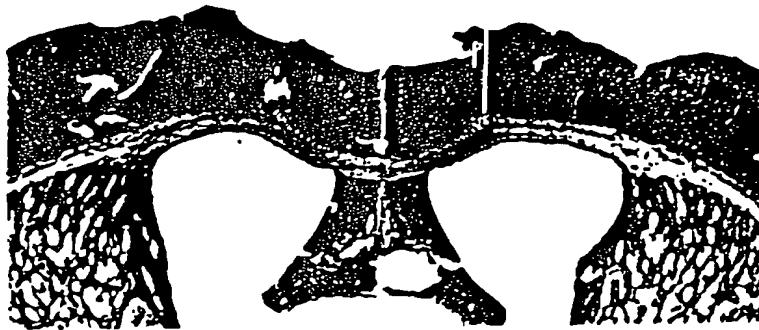


FIG. 5

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

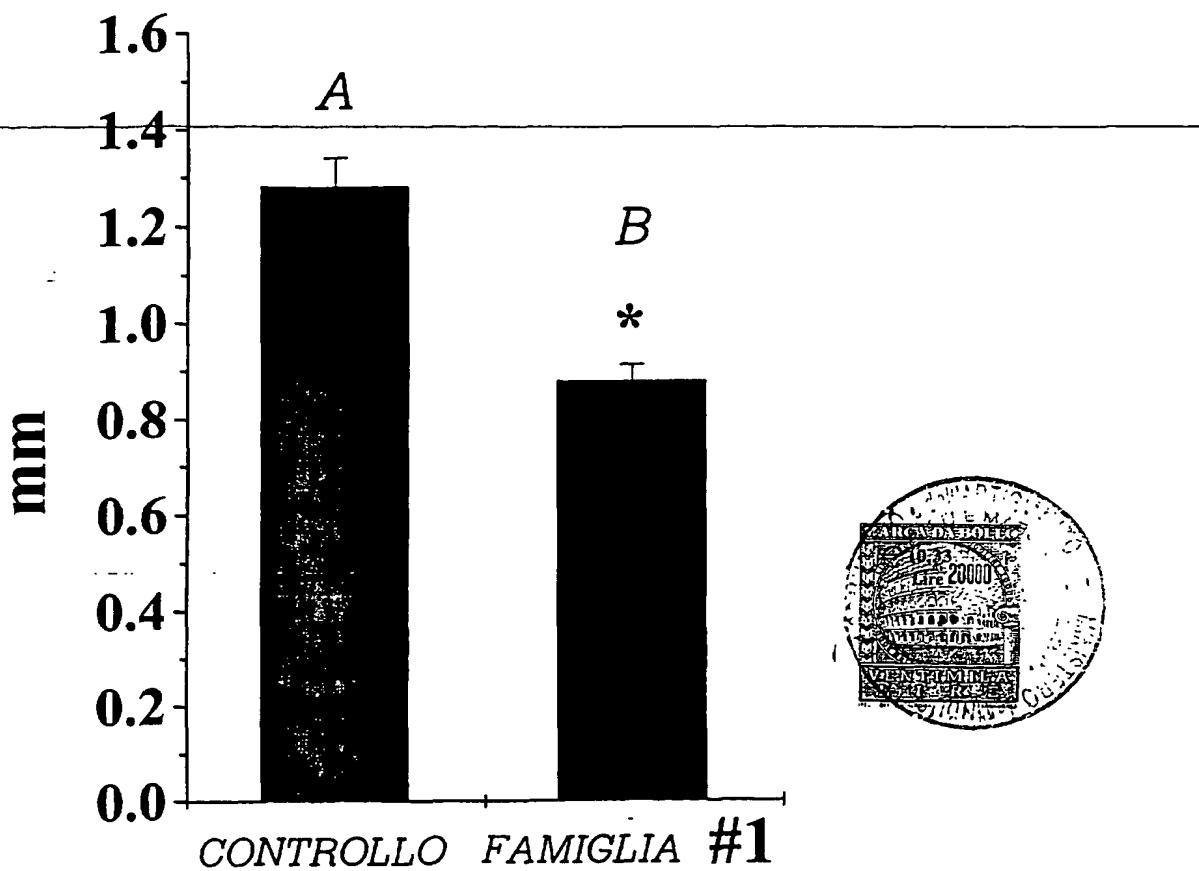
olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



6/32 RM 2000 A 000306

*SPESSORE CORTICALE*



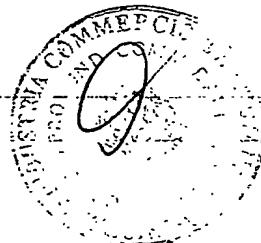
CONTROLLO : 1.282 +/- 0.059

FAMIGLIA #1: 0.879 +/- 0.033

FIG. 5c

c.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

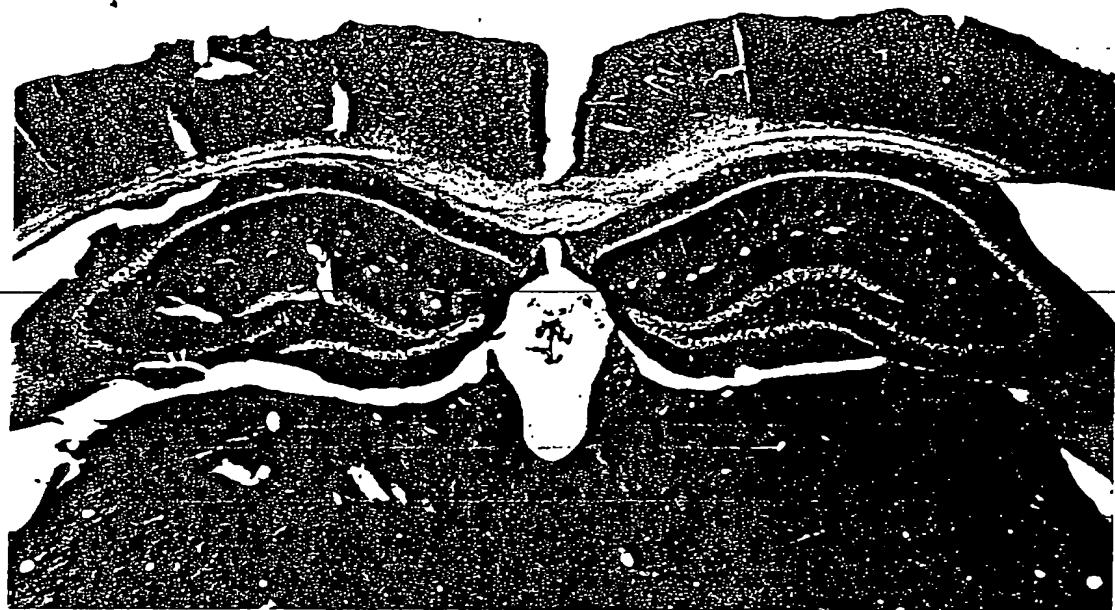
*olga capasso* UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



A

7/32

RM2000 A.000306



B



FIG. 6

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

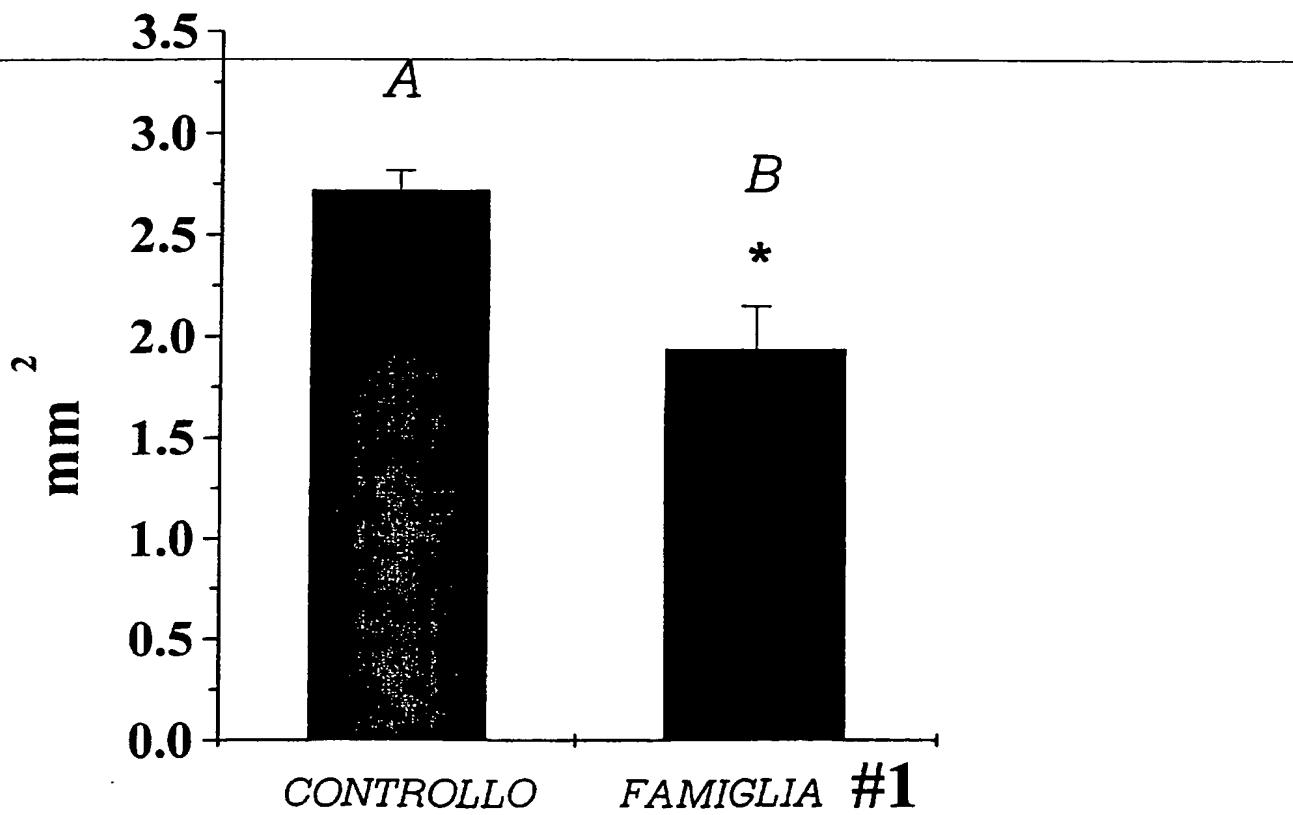
*olga capasso*



8/32

RM2000 A 000306

*SUPERFICIE DELL IPPOCAMPO*



CONTROLLO : 2.72 +/- 0.098

FAMIGLIA #1: 1.94 +/- 0.211

FIG. 6c

P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



*degli esemplari*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

9/32

A

RM2000 A 000306

B

FIG. 7

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

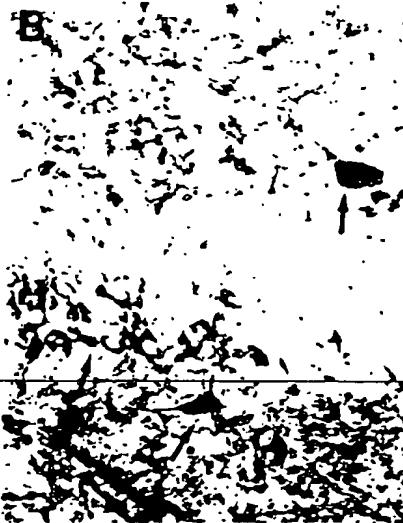


olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

10/32 RM 2000 A 000306

A



E

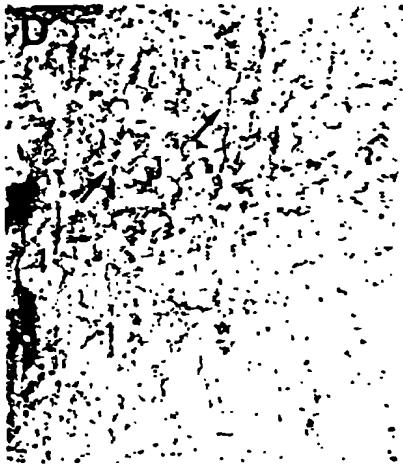
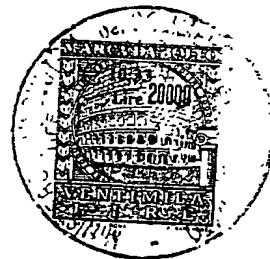


FIG. 8



D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

11/32

RM2000 A 000306

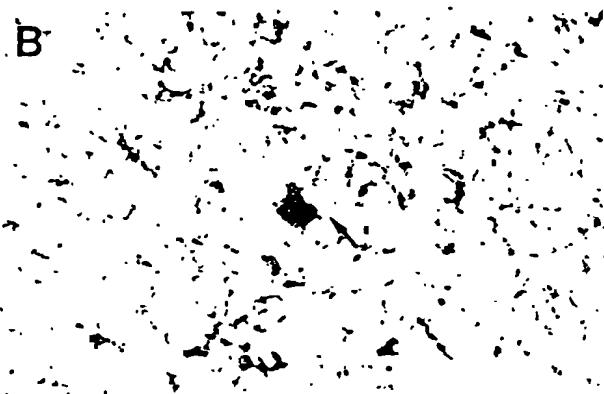
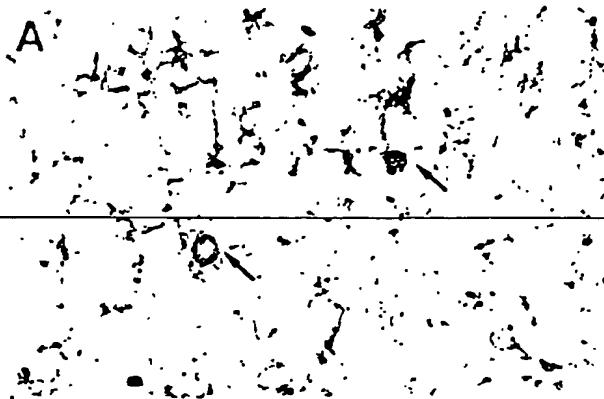


FIG. 9

D.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

dejca passo



12/32

RM2000 A 000306

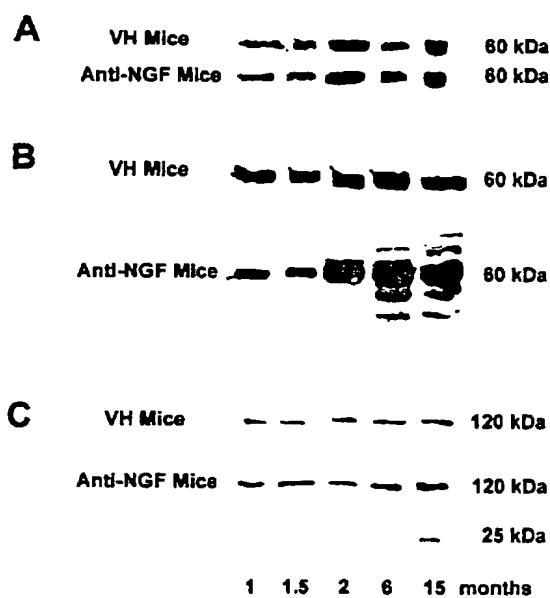
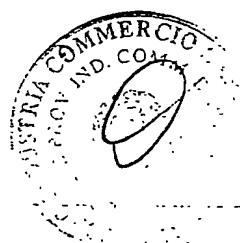


FIG. 10

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*olga Capasso*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



13/32

RM2000 A 000306

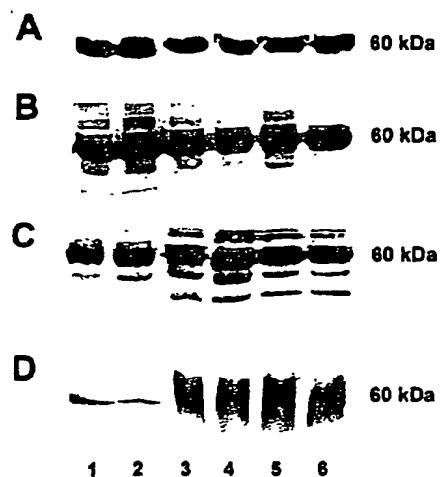
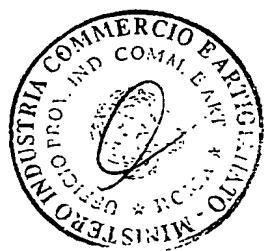


FIG. 11



P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

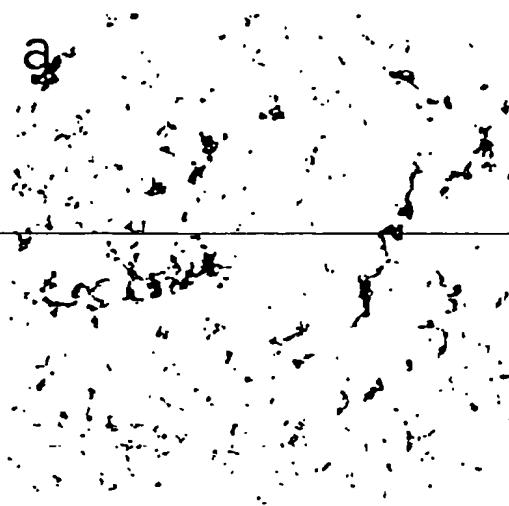
decapresso  
UN MA  
DER SOE  
Olan

**UN MANDATARIO**  
*per se e per gli altri*  
Olga Capasso  
(N° d'Iscr. 820 B)

14/32

RM2000 A 000306

a



b



c



## FIG. 12

D.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANG' & ZANARDO ROMA S.p.A.

deg ce passo

UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

15/32

RM2000 A 000306

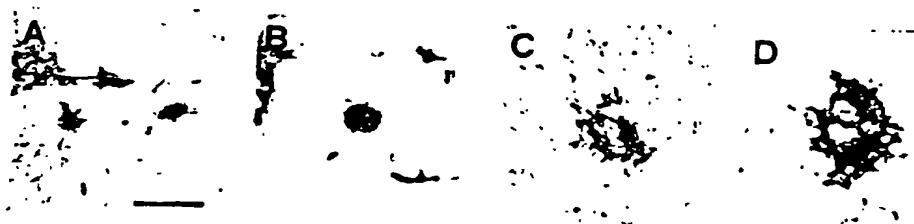


FIG. 13

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. "BARZANO" & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(n. d'iscr. 820 B)

olga capasso



16/32

RM2000 A 000306

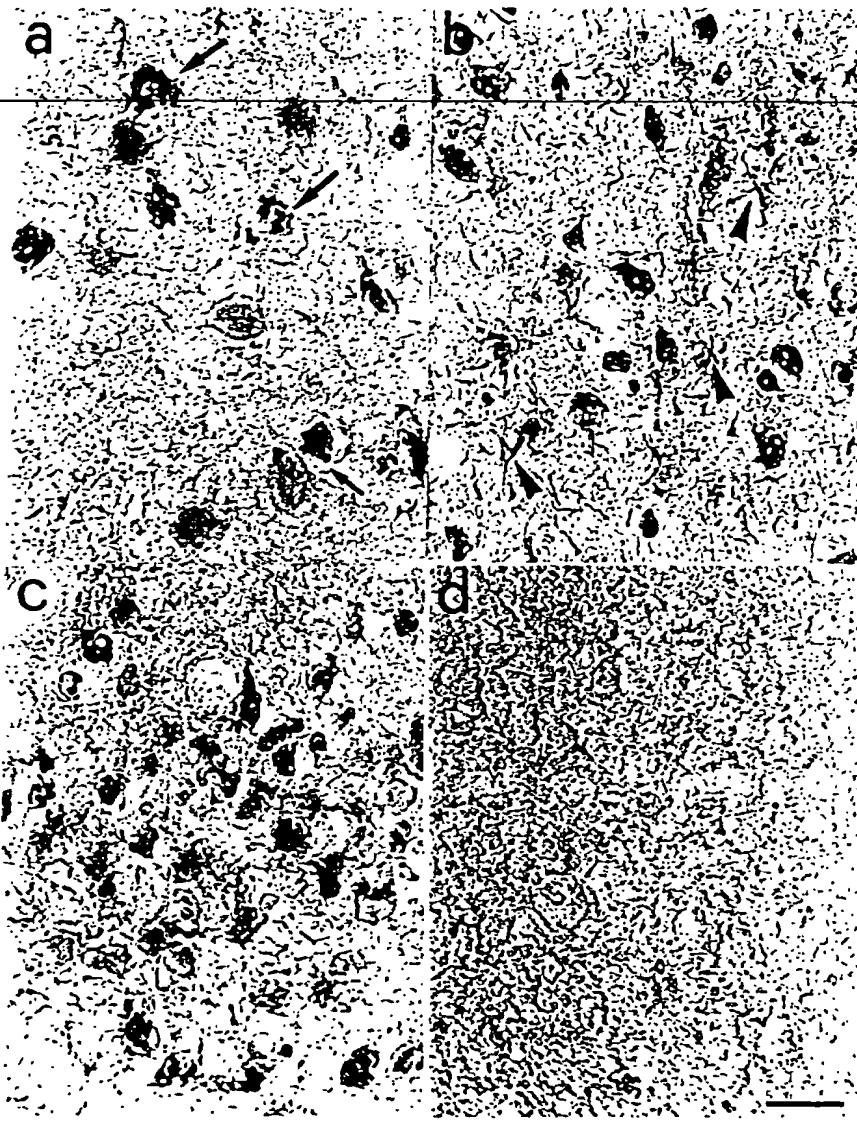
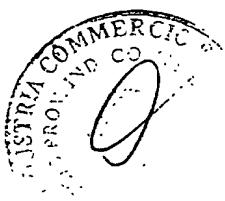


FIG. 14

P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*deg Capasso*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



17/32

RM2000 A 000306

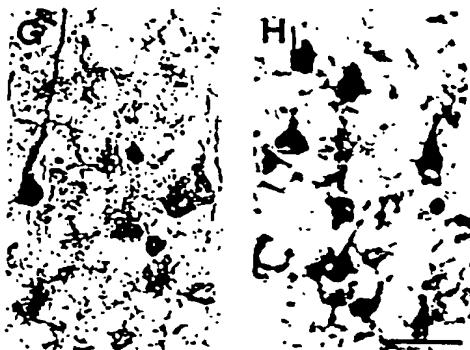
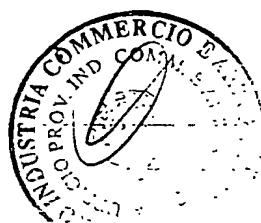


FIG. 15

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*deg CA pe ss*  
UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



18/32 RM 2000 A 000306

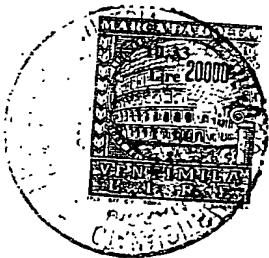
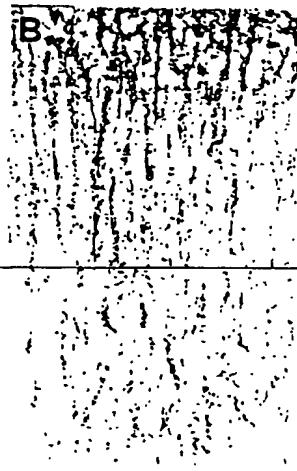
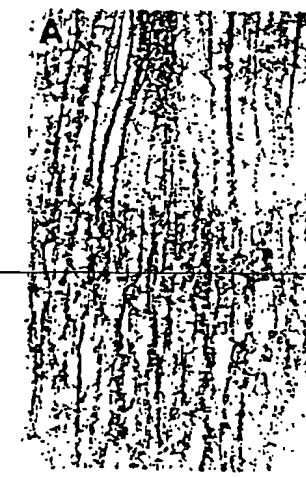


FIG. 16

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*des ce passe*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

19/32

RM2000 A 000306

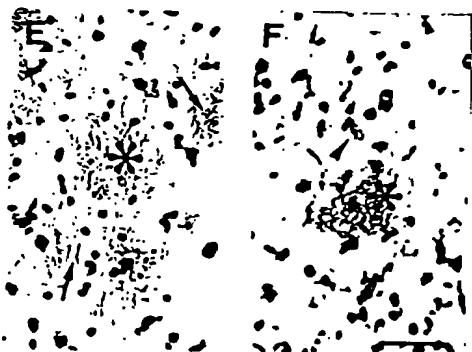


FIG. 17

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.D.A.

*olga capasso* UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



20/32

RM2000 A 000306

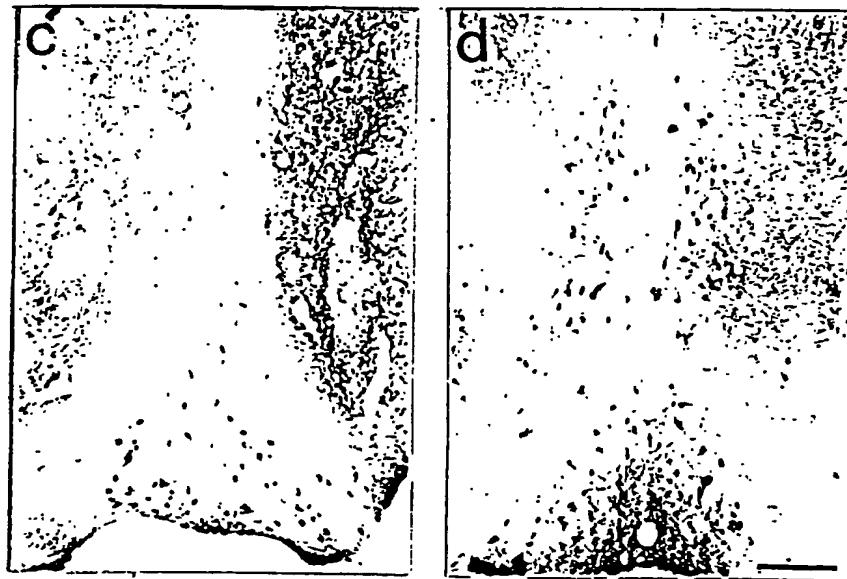


FIG. 18



D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

**UN MANDATARIO**  
per se e per gli altri  
**Olga Capasso**  
(N° d'iscr. 820 B)

21/32

RM2000 A 000306

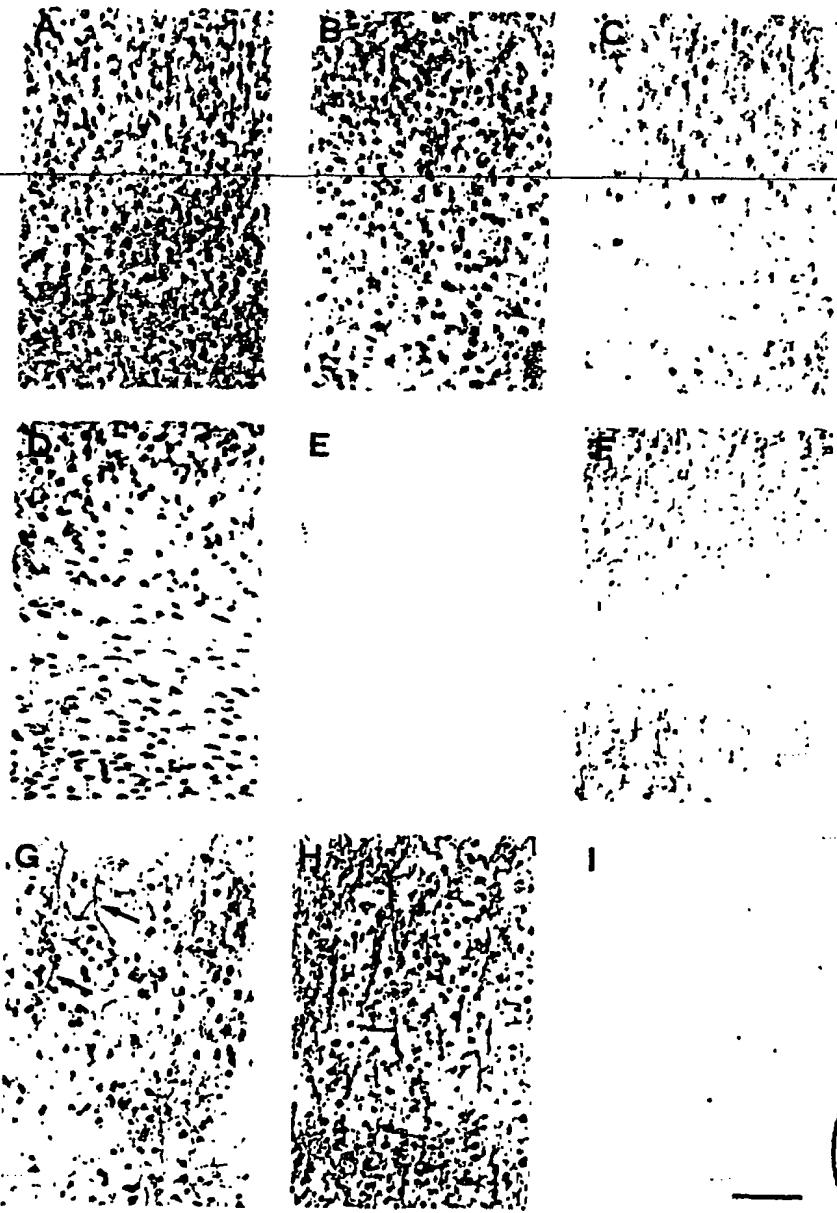


FIG. 19

P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

*degli ospiti*



22/32

RM2000 A 000306

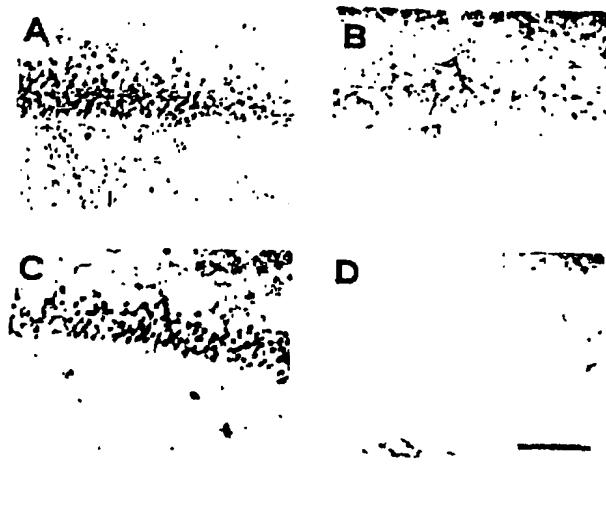


FIG. 20



D.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso

23/32

RM2000 A 000306



FIG. 21



P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*delege a posso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'Iscr. 820 B)

24/32

RM2000 A 000306

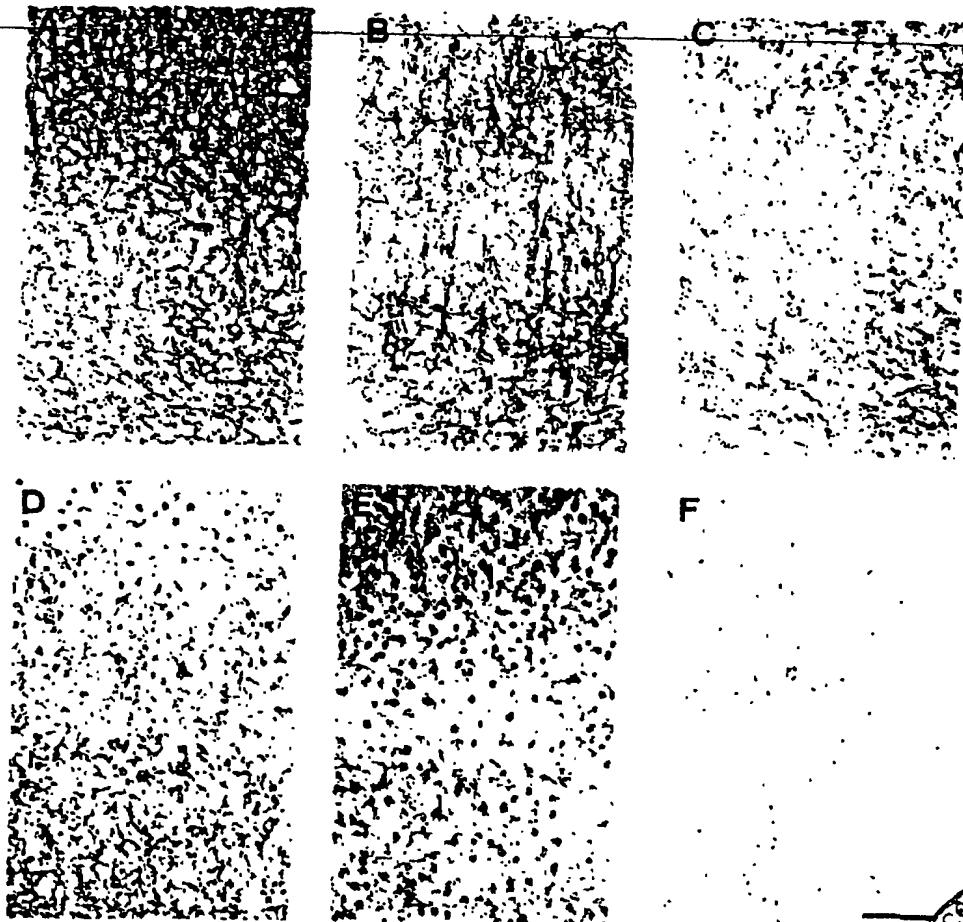
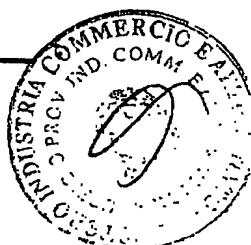


FIG. 22



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*olga capasso*

**UN MANDATARIO**  
*per se e per gli altri*  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

25/32

RM2000 A 000306

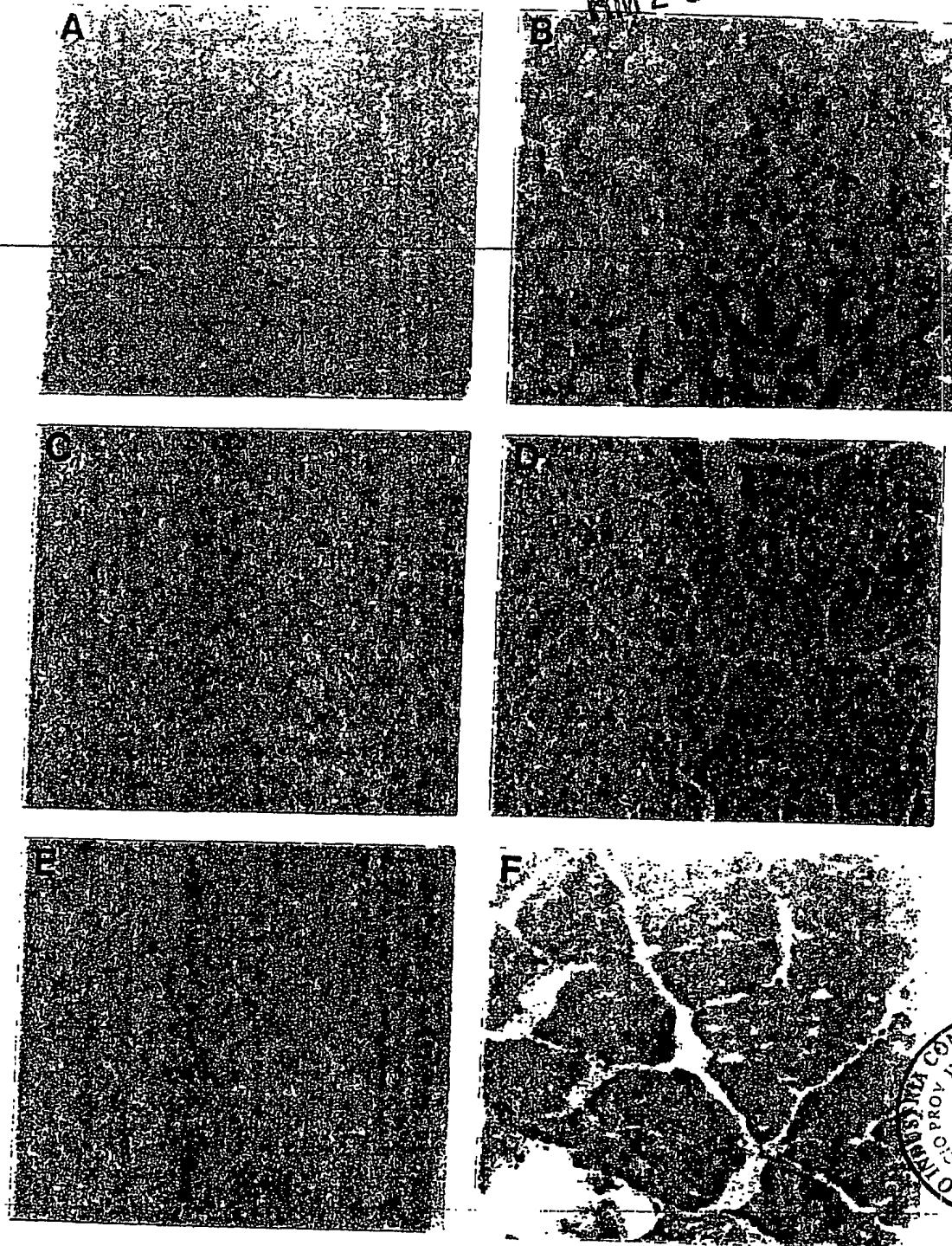


FIG. 23

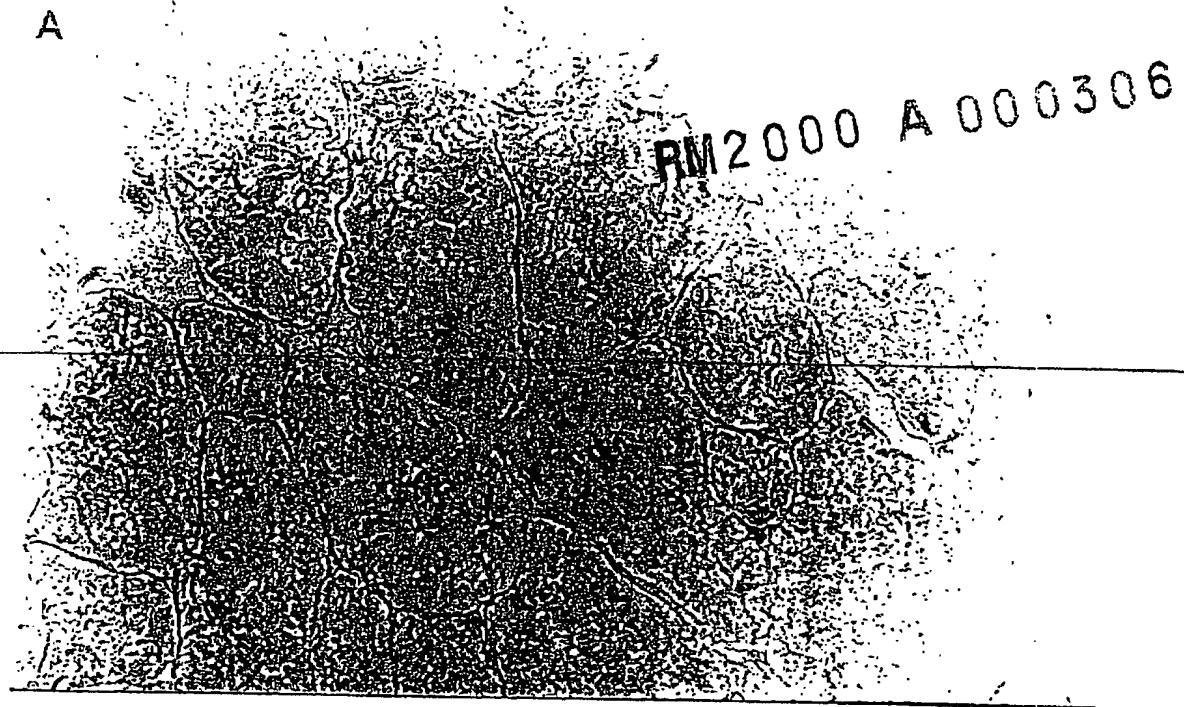
p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

26/32

A



B

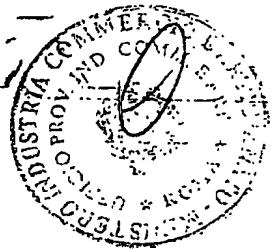
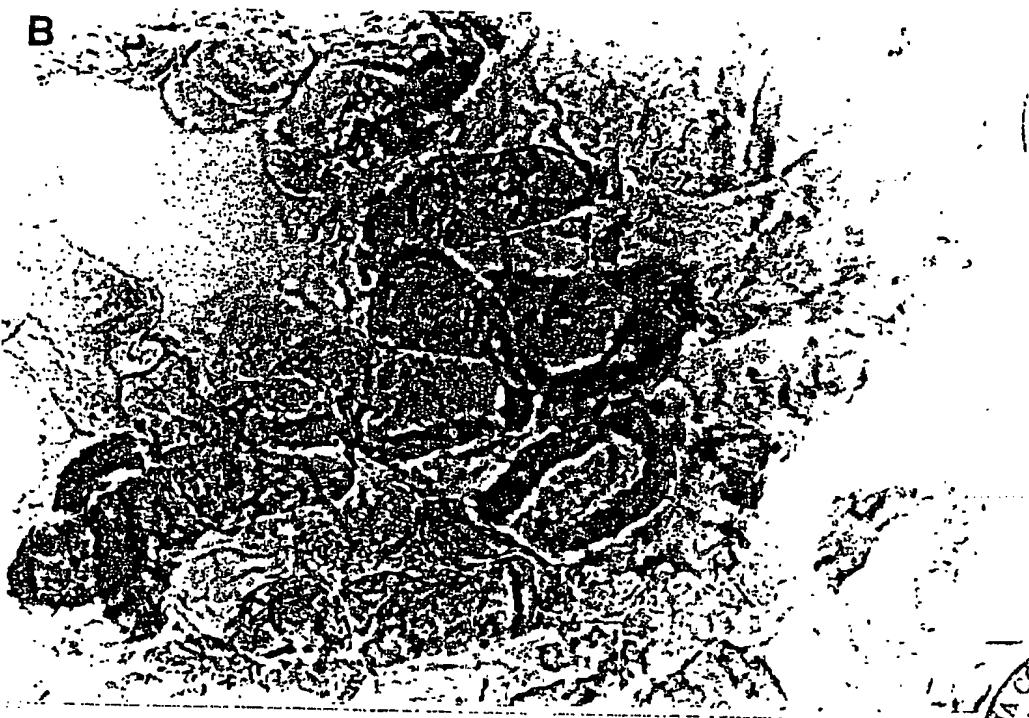


FIG. 24

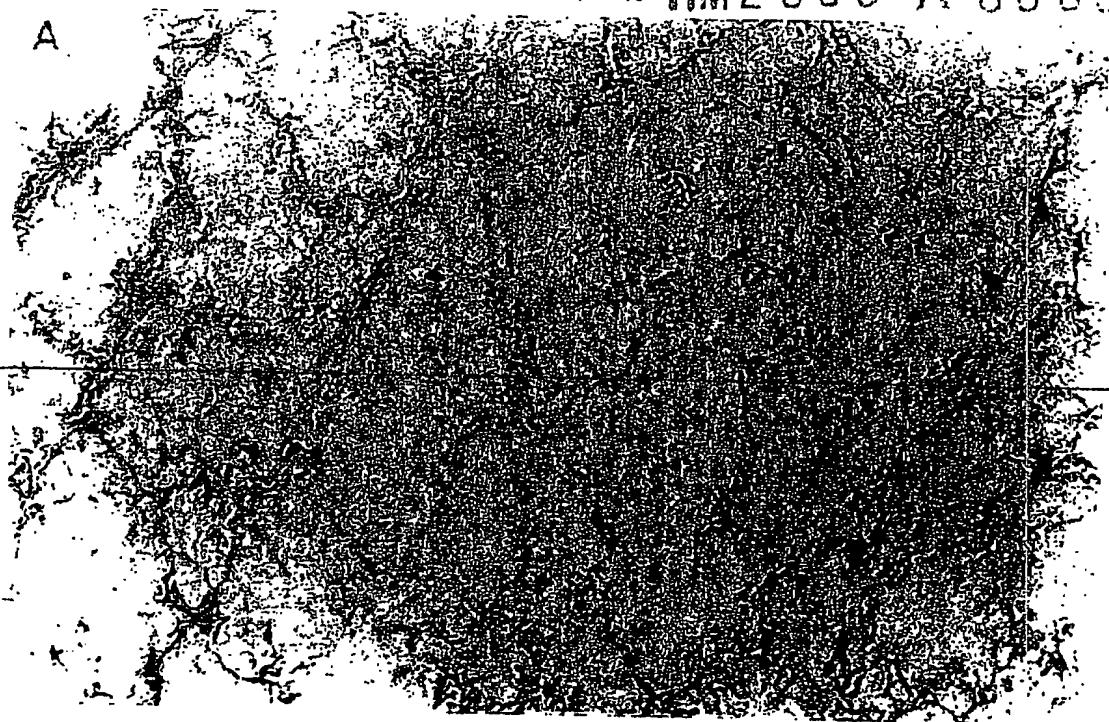
P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*dopo ca pe. 550*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

27/32 RM 2000 A 000306

A



B



FIG. 25

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

olga capasso



UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

28/32

RM2000 A 000336



FIG. 26

P.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

ON MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso



29/32

RM2000 A 000306

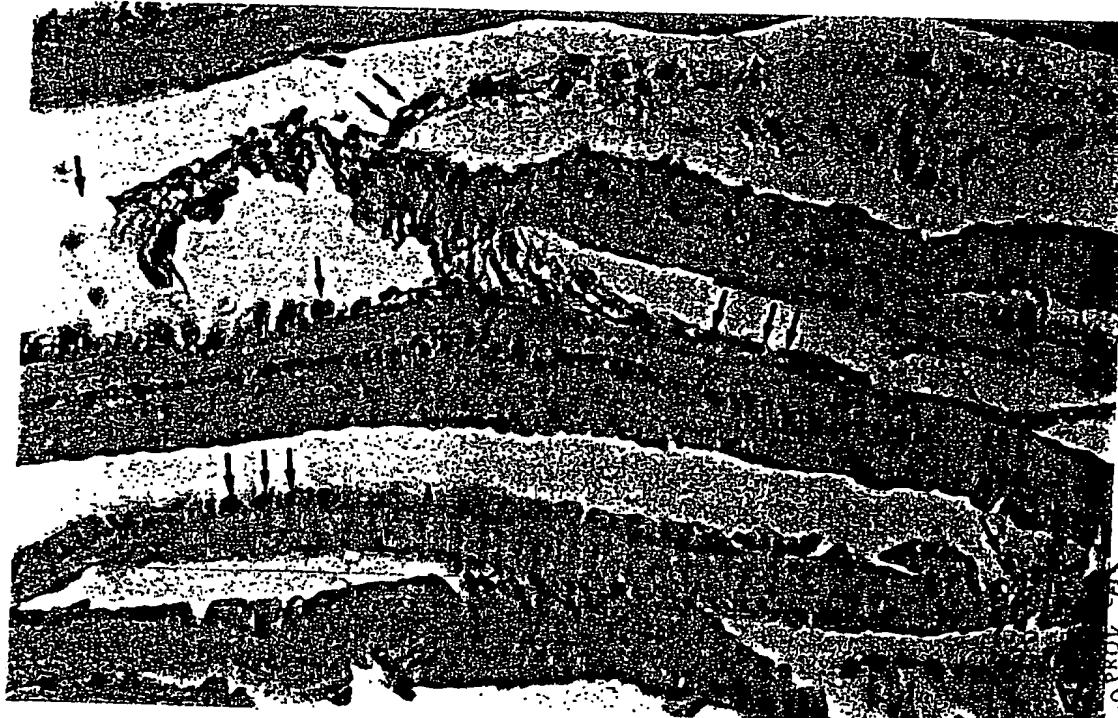
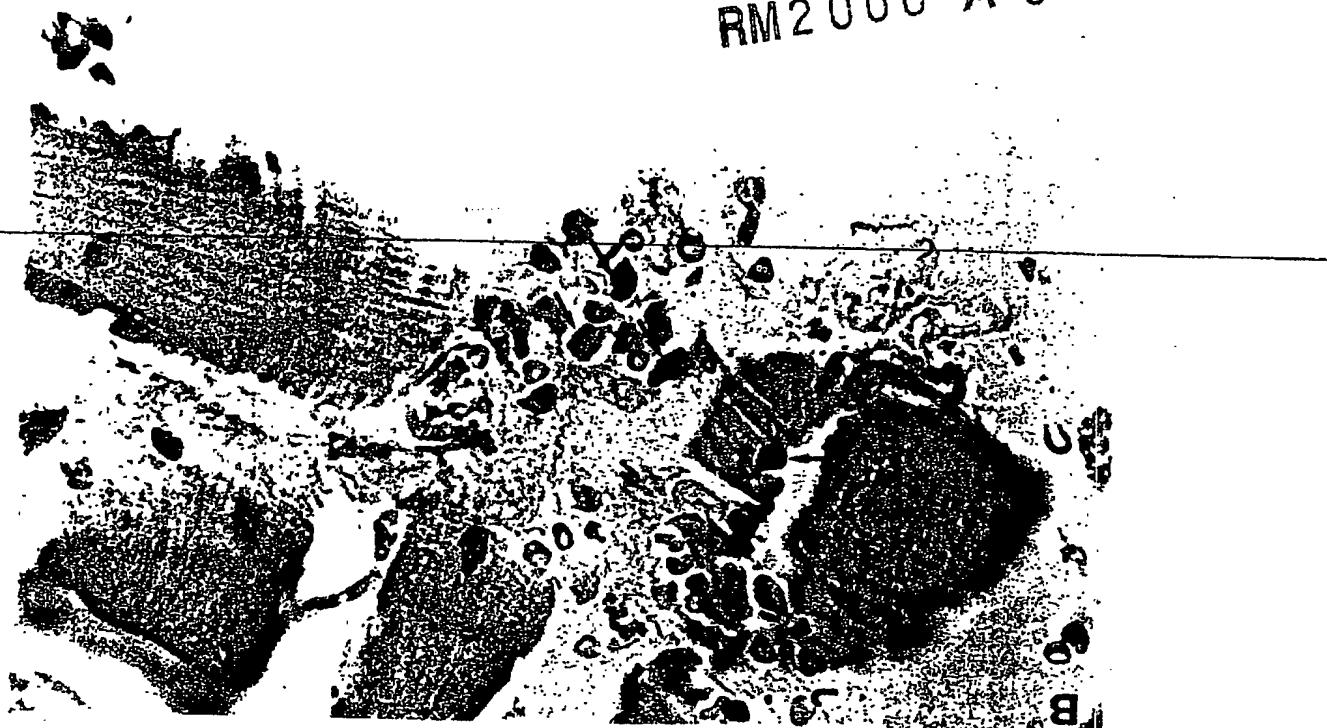


FIG. 27

S.I.S.S.-A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

30/32

RM2000 A 000306

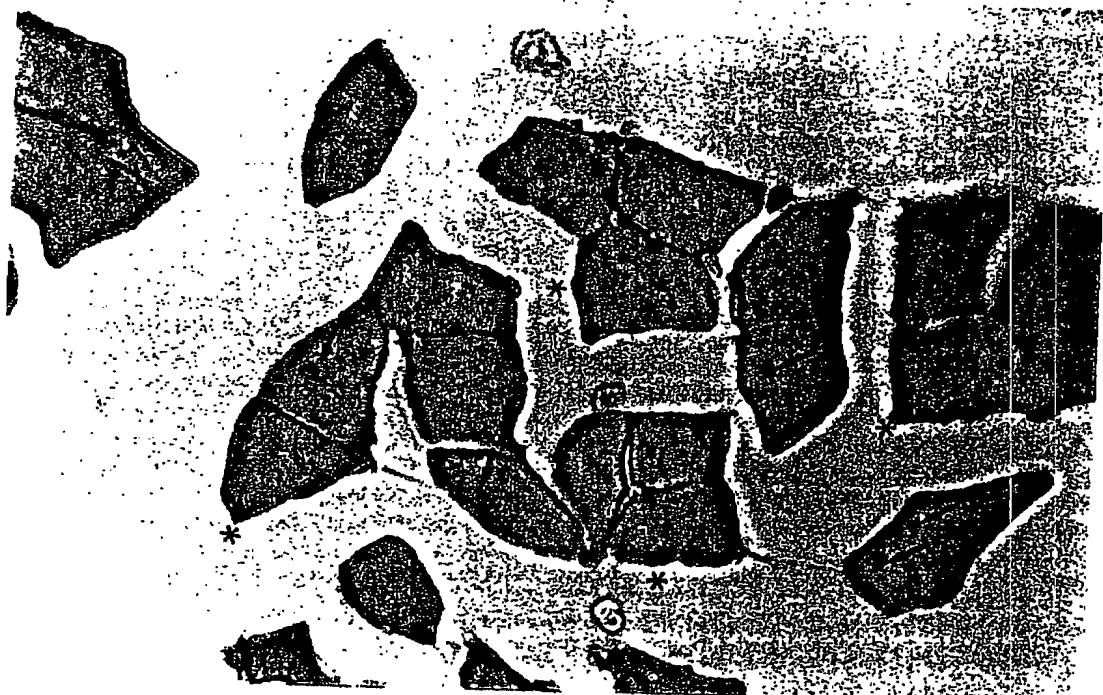


FIG. 28

P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



*doga ce pa sso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



31/32

RM2000 A 000306

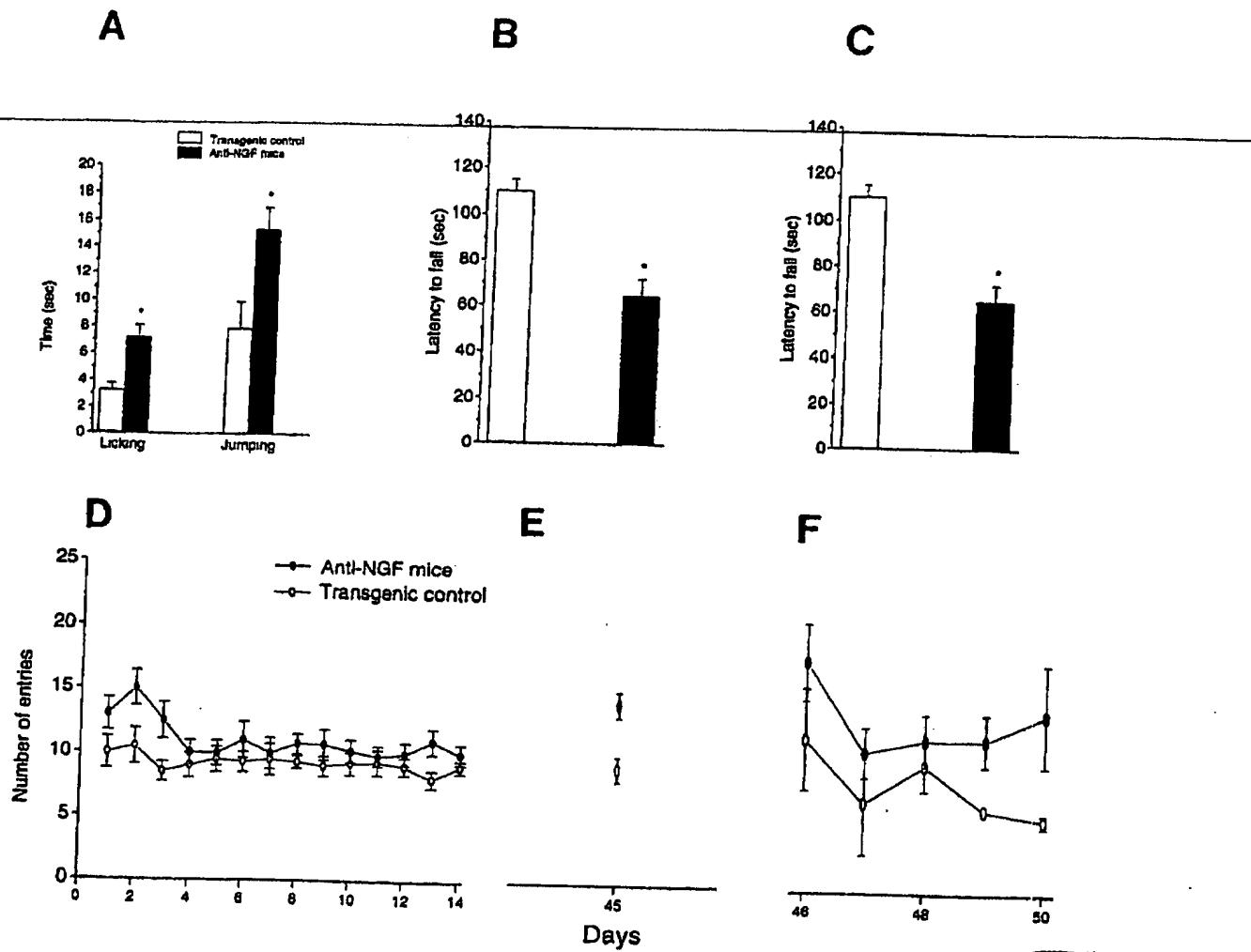


FIG 29

P.P. I. S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

doge ce pr sso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



32/32

RM2000 A 000306

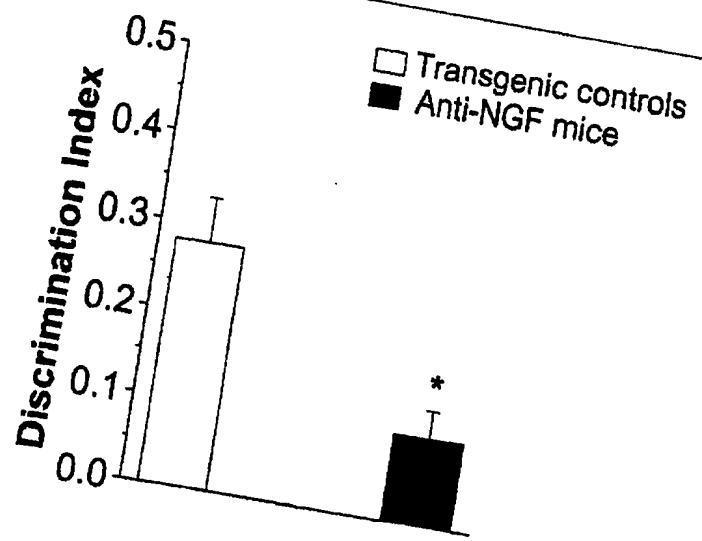


FIG. 30

P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*  
UN. MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)





TO THE MINISTRY OF PRODUCTIVE ACTIVITIES  
 ITALIAN PATENT AND TRADEMARK OFFICE - ROME  
 APPLICATION FOR PATENT OF INDUSTRIAL INVENTION, LATE FILINGS, EARLY  
 PUBLICATION

**A. APPLICANT**

1) Name S.I.S.S.A SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
 Domicile TRIESTE, TS code 80035060328  
 2) Name  
 Domicile code

**B. REPRESENTATIVE OF APPLICANT BEFORE THE I.P.T.O.**

surname, name CAPASSO Olga et al. fiscal code  
 office name ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA SPA  
 Via Piemonte No. 26 town ROME Postal code 00187 (prov.) RM

**C. ELECTION OF DOMICILE** name See above

Via No. town Postal code (prov.)

**D. TITLE** proposed class (section/class/subclass) group/subgroup

"Non-human transgenic animals able to express anti-NGF antibodies".  
 DOSAGE.

EARLY PUBLICATION: Yes No X If requested: Date No.

**E. INVENTORS** surname name surname name  
 1) CATTANEO, Antonino 3) RUBERTI, Francesca  
 2) CAPSONI, Simona 4)

**F. PRIORITY** country kind appln. No. filing date Encl.

1) None.  
 2)

**G. DEPOSITORY INSTITUTION FOR THE RECEIPT OF MICRO-ORGANISMS,** name

**H. SPECIAL NOTES**

None.

**ENCLOSED DOCUMENTATION**

No.

Doc. 1) 2 n. 51 abstract with main drawing, specification and  
 claims (compulsory, 1 copy)  
 Doc. 2) 2 n. 32 drawing (compulsory, if indicated in the  
 specification, 1 specimen)  
 Doc. 3) 1 follow Power of Attorney  
 Doc. 4) 0 Inventor designation  
 Doc. 5) 0 priority document with Italian translation thereof  
 Doc. 6) 0 authorization or assignment deed  
 Doc. 7) 0 complete applicant's name  
 8) payment receipts, total Liras 915.000= compulsory

FILLED IN ON 05.06.2000 SIGNATURE OF THE APPLICANT S.I.S.S.A SCUOLA  
 INTERNAZIONALE SUPERIORE

Signature OLGA CAPASSO

CONTINUES YES/NO NO of Ing. BARZANO' & ZANARDO ROMA SPA  
 IT IS REQUESTED CERTIFIED COPY OF THE PRESENT DEED YES/NO YES

PROVINCIAL OFFICE IND. COMM. HAND. OF ROME code 58  
 FILING CERTIFICATE APPLICATION NO. RM2000 A 000306 REG. A  
 The year TWO THOUSAND, the day FIVE, the month of JUNE  
 the above applicant has filed before me the undersigned; the present  
 application consisting of No. 00 annexed sheets for the granting of  
 the above patent.

*Milb Ballo*

FORM A

ABSTRACT OF THE INVENTION WITH MAIN DRAWING

APPLICATION No. RM2000A000306 Reg. A FILING DATE 05 June 2000  
PATENT No. GRANTING DATE

A. APPLICANT (1)

1) Name S.I.S.S.A SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
Domicile

D. TITLE

"Non-human transgenic animals able to express anti-NGF antibodies".

L. ABSTRACT

"Non-human transgenic animals for an anti-NGF (Nerve Growth Factor) antibody able to mimic neurodegenerative syndromes, to be used as a model to study said pathologies and provide therapies therefore.

M. DRAWING

*Daniele Botti*

### Description

for a patent application for industrial invention having the title: "Non-human transgenic animals able to express anti-NGF antibodies"

in the name of: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi

5 Avanzati

Inventors: Cattaneo Antonino, Capsono Simona, Ruberti Francesca

---

### Technical Field

The present invention relates to non-human transgenic animals for  
10 an anti-NGF (Nerve Growth Factor) antibody able to mimic  
neurodegenerative syndromes, to be used as a model to study said  
pathologies and provide therapies therefor.

### Background

The nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini, 1952) is a  
15 pleiotropic neurotrophin playing a fundamental role in the neuronal  
differentiation both at central and peripheral nervous system. Accordingly  
NGF proves to be indispensable for the differentiation of the cholinergic  
neurons of the basal telencephalon, the sensitive neurons and those of the  
sympathetic nervous system.

20 NGF is also necessary in steps following the differentiation, as it is  
able to modulate the phenomena of cellular apoptosis (Davies, 1992),  
synthesis of cytoskeleton elements during the neuroaxon regeneration  
(Snider, 1989), synthesis of peptide and enzyme neurotransmitters (Eide  
et al., 1993), synapse rearrangement and neuronal proliferation (Schnell et  
25 al., 1994) and that therefore it plays a fundamental role also in

neurodegenerative processes and neuronal ageing (Connor & Dragunow, 1998).

The activity mechanisms regulating such different activities are yet to be clarified: the pleiotropic activity of NGF and unavailability of adult animal model do not allow to relate its expression to an unique and definite phenotype or prefixed and recognisable function. The inactivation of NGF in adult animal models has been attempted by different approaches, among which immunoneutralisation by systemic delivery of anti-NGF neutralising antibodies (Levi-Montalcini et al., 1960) o gene "knockout" in transgenic mice (Crowley et al., 1994).

However in both cases the results were rather disappointing because the systemically delivered antibodies do not pass the blood-encephalon barrier and the neutralising effect of NGF in the other districts depends on too many additional factors difficult to be standardised, like anti-serum level and affinity, clearance rate or polyclonal antibody cross-reactivity with other neurotrophins, etc.

On the other hand the "knockout" approach in mice allowed to confirm the importance of said neurotrophin and not redundancy of the intracellular signalling system thereof, but failed to provide the expected adult model for the study of the NGF: indeed the  $ngf^{-/-}$  transgenic mice die shortly afterwards the birth before an eventual development of degenerative pathologies. The phenotype of  $ngf^{-/-}$  heterozygotic mice also proved not very useful to study the pathologies associated with the NGF unavailability in adult: the NGF level in the heterozygotic mouse is only 25 % lower than in the control, it presents only a phenotype with a faint



cholinergic deficit, without apparent anomalies and in relation with human neurodegenerative pathologies.

However various experimental evidences suggest that NGF plays a key role in neurodegenerative syndromes (Connor & Dragunow, 1988).

5 Senile dementia and Alzheimer's disease (AD) are neurodegenerative syndromes characterised by a progressive dementia. The Alzheimer's disease affects 5 % of 70 year old people and more than 30 % of about 80 year old people. Its incidence, in relation to the improvement of the life conditions and lengthening of the mean age, is destined to double in the

10 next thirty years. The social costs for said pathology are very high. The Alzheimer's disease first affects the neurons of the cerebral cortex and is characterised both by clinical (for example, the progressive loss of cognitive capacities) and characteristic pathological symptoms (which can be diagnosed only post-mortem), as the formation of extracellular plaques of  $\beta$ -amyloid protein, neurofibrillar intracellular aggregates, consisting of hyperphosphorylated tau protein and "neuronal loss" (Goedert, 1993; Mandelkow and Mandelkow, 1993; Selkoe, 1994). In the central nervous system the cholinergic system is particularly affected, resulting in a decrease of the acetylcholine synthesis by the cholinergic neurons of the

15 basal telencephalon and a selective loss of said neurons. The cholinergic neurons are dependent on NGF which acts through high (TrkA) and low affinity (p75) receptors. Further the Alzheimer's disease is associated to motorial disorders resulting from the loss of cognitive capacities and coordination as well as from pathologies peculiar of the skeletal muscle as

20 amyloid deposition within the skeletal muscle cells (Fukuchi et al, 10998;

25

John D. Morris

Jin et al., 1998). It is interesting to point out that NGF further exerts a function on non neuronal cells, also due to the presence of above NGF receptors, p75 and TrkA, on muscle cells too and for the finding of different isoforms of the TrkA receptor apparently not expressed in the nervous system.

In spite of enormous investments up to now an early diagnosis and a suitable therapy for the AD are unavailable. The reason results, above all, from the unavailability of experimental cellular or animal models which mimic in a complete and accurate way the formation of the aberrant neuropathological structures. During the last years various transgenic models have been suggested in order to define the aetiopathogenesis of the Alzheimer's disease and select useful compounds for the therapy thereof. Starting from the observation of the histological, immunological, and molecular characteristics of the Alzheimer's disease, as the presence of deposits of  $\beta$ -amyloid protein in the central nervous system, particularly at level of the cerebral cortex and in the hippocampus, have been obtained transgenic animals wherein the wild-type  $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) is expressed at levels higher than endogenous or is expressed in a mutated form wherein the mutations are found in the genetic forms of the disease (Hsiao, WO 97/87492 and Games, WO 96/40896). Other suggested transgenic models relate to animals wherein the transgene is *PRESENILINE-1* or -2 (Citron et al., 1996; Strchler-Pierrat et al., 1997), alone or together with the amyloid precursor protein (APP) (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999), tau protein (Gotz et al., 1995; Brion et al., 1999) or  $\beta$ APP protein C-99



fragment (Jin et al., 1998).

However up to now all the suggested models develop only some of the morphological, histological or molecular markers defined as characteristic for the diagnosis of the Alzheimer's disease and therefore 5 do not represent complete models, effectively suitable to study and provide successful therapies and test drugs.

#### Description of the Invention

In the present invention a non-human transgenic animal able to express ubiquitously an anti-NGF neutralising antibody is described. 10 Further is described the method of preparation of the transgenic animal and the use of this model of phenotypic knockout to evaluate the NGF pleiotropic effects. A further aspect of the invention relates to the use of the transgenic mouse as animal model for the neurodegenerative syndromes, associated or not to muscle pathologies, as the Alzheimer's 15 disease and the use thereof for the selection of the drugs suitable to block the neuronal degeneration or loss of the muscle activity. A further aspect of the present invention relates to the use of NGF to correct muscle pathologies and cholinergic deficit at cerebral level and neurodegenerative pathologies as AD.

#### Detailed Description of the Invention

The present invention describes a non-human transgenic animal able to express an anti-NGF (Nerve Growth Factor) neutralising antibody. The antibody used ( $\alpha$ D11) binds NGF in correspondence to an epitope responsible for the bond with its high affinity receptor, TrkA, thus blocking 25 the binding and therefore it acts as a neutralising antibody. The epitope

recognised by the  $\alpha$ D11 antibody (comprising the 41-49 amino acids of NGF) corresponds to a not very conserved sequence in the neurotrophins family and therefore it is NGF specific. Alternatively antibodies able to block the intracellular "signalling" can be used.

5 Alternatively the recombinant antibody can be in the Fab, Fv or single chain Fv form.

Surprisingly the authors of the invention found that transgenic mice for anti-NGF antibodies, which do not express appreciable levels of the antibody in the period immediately after the birth and express such an antibody at levels between 50 and 500 ng/ml in the adult period, develop a complex pathological picture whose characteristic features are:

1) muscle dystrophy, particularly at level of the rear limbs;

2) dilatation of the cerebral ventricles, symptom often used in clinics as an indication of neurodegenerative diseases, like the Alzheimer's disease (Luxenberg et al., 1987);

3) atrophy of the cerebral cortex sometimes associated with the complete disappearance of the hippocampus;

4) loss of neurons and/or apoptosis, symptom related to the Alzheimer's disease (Mizutani et al., 1990);

5) deposition in CNS of plaques of  $\beta$ -amyloid protein, at level of the *PARA-CINGULAR* cortex and *NEOSTRIATUM*;

6) deposition of plaques of  $\beta$ -amyloid protein in the skeletal muscle;

7) neurofibrillar tangles and dystrophic neurites;

8) cognitive deficits characterised by defects in the "working memory" and spatial orientation deficits;



- 9) cholinergic deficit;
- 10) hyperphosphorylation of the tau protein at cerebral level;
- 11) hyperphosphorylation of the tau protein in the muscle;
- 12) infiltration of inflammatory cells in the muscle;
- 5 13) modifications of the sympathetic innervation of the spleen and reduction of the splenocyte viability;
- 14) aggregation of the tau protein in the encephalon.

An aspect of the present invention relates to the anti-NGF transgenic animal as a model to study the pathologies induced by the NGF deprivation. The NGF deprivation at systemic level can result in various aetiologies, of autoimmune type too. At local level a lack or limited availability of NGF by target cells can result, for example, from traumatic event (denervation).

Surprisingly many characteristics of the transgenic animal model described in the present invention are completely assimilable to those presented at macroscopic, histological and molecular level by the Alzheimer patients. The present invention therefore provides a non-human transgenic animal model to study the Alzheimer's disease. The characteristics of this model are summarised in table 1 where they are compared with those of other transgenic animals suggested for said disease. As it is clear from the table, the transgenic animal of the present invention exhibits characteristics which, as a whole, have never been observed in up to now provided animal models (Hsiao et al. 1996 and WO 95/48792 and WO 97/48792; Citron et al., 1997; Borchelt et al., 1997; 20 Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999; Gotz et al., 1995; Brion et al., 25

*M. Borchelt*

1999; Jin et al., 1998; Games et al., 1995; Irizzary et al. 1997). Table 1 follows.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Chaudhury".

Table 1  
DEFICIT

		Transgenic mouse for						
		APP <sup>1,5,9,10</sup>	PS-1 <sup>2</sup>	APP <sup>1,5,9,10</sup>	Human mutated and PS-1 <sup>2</sup>	Human mutated tau protein <sup>6</sup>	βPP C-99 fragment <sup>8</sup>	Anti-NGF antibodies (anti-NGF mouse)
5	Encephalon size	-	-	-	-	-	-	++
	Thickness reduction of the cerebral cortex	-	-	-	-	-	-	+++
	Cerebellum atrophy	-	-	-	-	-	-	++
	Dilatation of cerebral ventricles	-	-	-	-	-	-	++
10	Memory and orientation deficits	++	-	-	-	-	-	++
	Neuronal loss	-	-	-	-	-	-	++
	Apoptosis	-	-	-	-	-	-	++
	Amyloid plaques	++	++	+++	-	-	-	++
	Tau hyperphosphorylation	-	-	-	++	++	-	++
15	Neurofibrillary tangles/ neuropil threads	++	-	-	+	+	-	+++
	Activation of the microglia cells	-	-	-	-	+	-	++
	Cholinergic deficit	+	-	+	-	-	-	++
	ATROPHY OF THE SKELETAL MUSCLES	-	-	-	-	-	++	+++

*M. Hernandez Bolaños*

DEFICIT	Transgenic mouse for						
	APP <sup>1,5,9,10</sup>	PS-1 <sup>2</sup>	APP <sup>1,5,9,10</sup>	Human mutated and PS-1 <sup>2</sup>	Human mutated tau protein <sup>6</sup>	βPP C-99 fragment <sup>8</sup>	Anti-NGF antibodies (anti-NGF mouse)
5 Amyloid deposits in the skeletal muscles (Congo red staining)	-	-	-	-	-	++	++
10 Amyloid deposits in the skeletal muscle (anti-APP IH)	-	-	-	-	++	++	++
10 Hyperphosphorylated tau IN THE MUSCLE (IH)	-	-	-	-	-	-	+
10 Macrophage infiltration	-	-	-	-	-	+++	+++
10 Vacuolization of the muscle fibre	-	-	-	-	-	+++	++
15 Increase in the number of nuclei in central position (myofiber)	-	-	-	-	++	++	++

<sup>1</sup>Hsiao et al., 1996; <sup>2</sup>Citron et al., 1997; <sup>3</sup>Borchelt et al., 1997; <sup>4</sup>Holcomb et al., 1998; <sup>5</sup>Wong et al., 1999; <sup>6</sup>Gotz et al., 1995;

<sup>7</sup>Brion et al., 1999; <sup>8</sup>Jin et al., 1998; <sup>9</sup>Games et al., 1995; <sup>10</sup>Irizarry et al., 1997



Thus it is clear that the transgenic animal of the present invention constitutes a much more complete animal model for the Alzheimer's disease than those up to now suggested. Indeed the deficits recognised in the anti-NGF mouse, resulting from the transgene expression, are at level of both 5 central and peripheral nervous system, at cognitive level, at muscle level and further at morphological-functional level in the spleen wherein anomalies in the expression pattern of the immunoglobulins can be found. In this regard the ever-increasing experimental evidences indicating as central the role played by the immune system in the development of the Alzheimer's disease 10 are very interesting (Kalaria, 1993).

The preparation of the transgenic animal is carried out by crossbreeding of two strains of parent transgenic mice, which are transgenic because of the heavy and the light chain of an anti-NGF antibody, respectively, and such a method of preparation is a further aspect of the 15 present invention. The two strains of the parent transgenic animals are prepared by microinjection of plasmid DNA in ES cells or oocyte fecundated according to standard methods known by those skilled in the art.

The plasmid vectors containing the transcription units for the cDNA expression of both immunoglobulin chains are purified, for example by 20 banding technique using a CsCl continuous gradient, then diluting by physiological saline. The vectors can be injected as such in the pro-nucleus of fecundated oocytes, can be made linear by enzymatic restriction in a unique site or the transcription units can be separated from the vector by

*Al Alzheimer Park*

enzymatic restriction, purified, for example by gel electrophoresis or ion exchange chromatography, and separately introduced in the pronuclei. Preferably murine oocyte is used, more preferably it is from B6SJI strain. The two immunoglobulin chains of the anti-NGF antibody can be chimeric, 5 obtained by assembling the variable murine regions of an anti-NGF monoclonal antibody, like Mab  $\alpha$ D11, having human constant regions of K light and  $\gamma$ 1 heavy chains, as described in the present invention or derived as such from the specific cDNA of the secreting hybridoma. The expression of the two antibody chains in the transgenic mouse is controlled by a strong or 10 viral promoter, as CMV-IE (Cytomegalovirus Immediate Early), which is often expressed ubiquitously. Other ubiquitous promoters which can be used are RSV (Rous Sarcoma Virus) LTR or SV40 (SV40-IE) early gene promoters. According to a further embodiment of the invention, in order to modulate the expression of the correctly assembled and functional only in particular 15 districts of the organism the two transgenes can be brought under the control of two different promoters. In order to express the functional antibody only in a particular district or control the same over the time, can be used however tissue-specific or inducible promoters which can be different for the two antibody chains.

20 The preparation of the antigenic animal carried out according to the method of the invention determines the expression of the functional antibody in the adult transgenic animal at levels about 2000 times higher than at the birth and this allows, on one hand, according to the method of the invention,



to increase up to 80 % the efficiency in the production of viable transgenic brood for both antibody chains, and on the other hand to point out the phenotype resulting from the NGF activity only in the adult period, avoiding the neutralisation thereof during the neuronal differentiation.

5 The transgenic mice obtained according to the method of the invention are able to express, at different level and in any case at amounts in the range from 50 to 500 mg/ml of serum, the functional chimeric antibody consisting of both the correctly assembled and secreted chains and said transgenic mice do not produce a lethal phenotype during the first post-natal period, as 10 opposed to the transgenic animal obtained by microinjection of the plasmids encoding for both the immunoglobulin chains in the same oocyte.

The experiments of the authors of the invention pointed out that the neurodegenerative pathology at the encephalon level is preceded by an early (2 month age) tau hyperphosphorylation and amyloid deposition in the back 15 or lower limb skeletal muscles. It is therefore within the scope of the present invention the use of the skeletal muscle monitoring for an early diagnosis of neurodegenerative diseases.

Further it is pointed out that the muscular system phenotype of the anti-NGF mouse can be reversed by NGF local administration. According to its further 20 aspect, the invention therefore is directed to the use of NGF for the preparation of pharmaceutical compositions to be used for the therapy of muscular pathologies, as muscular dystrophy/atrophy. The administration of said neurotrophin can be carried out by different routes among which there



are: intramuscular injection of NGF, for example recombinant NGF, dissolved in suitable physiological saline, or direct injection of plasmid or recombinant viral vectors, for example adenovirus, or by implant in the muscle of cells genetically engineered for the NGF secretion. The dose can depend on 5 various variables as the specific activity of the protein, severity of the pathology to be treated, general conditions of the patient and in any case will be from 2 to 100 µg/kg of body weight.

#### Description of the Drawings

Figure 1. Molecular characterisation of the parent transgenic mice (A):  
10 Transcription units used for the production of the transgenic mouse: light chain (upper panel) and heavy chain (lower panel). CK and CH1-CH3, human constant regions of the light (K) and heavy ( $\gamma$ 1) chains; variable regions of the light (VL) and heavy (VH) chains of the  $\alpha$ D11 monoclonal antibody; Cytomegalovirus pCMV promoter. (B): Scheme of the 15 crossbreeding carried out to generate the anti-NGF transgenic mouse expressing the anti-NGF functional antibody. VK- $\alpha$ D11 X VH- $\alpha$ D11 (VK: transgenic parent line for the light chain of the  $\alpha$ D11 antibody; VH: transgenic parent line for the heavy chain of the  $\alpha$ D11 antibody. (C): PCR analysis of the VK (upper panel) and VH (lower panel) transgenes. From the gel it is 20 possible to see the analytical results obtained for 12 homozygotic mice cross-bred with non transgenic mice. (D): Dot blot analysis of four murine lines expressing the light or heavy chain of  $\alpha$ D11 antibody (VK- $\alpha$ D11 or VH- $\alpha$ D11). (E): VH- $\alpha$ D11 (left) and VK- $\alpha$ D11 (right) levels measured in the heart





at P1 and P90 days by Phosphoimaging analysis normalised for  $\beta$ -actin mRNA (count average +/- SEM).

Figure 2: Expression of the functional anti-NGF antibody in neuronal cells

(A): Expression of the VH chain in Purkinje cells from cerebellum of transgenic mouse expressing the heavy chain (C line: negative control).

Value of scale bar = 38  $\mu$ m. (B): Expression of VK (left) and VH (middle) in

DRG (Dorsal Root Ganglia) of family 1 anti-NGF mice (transgenic for both chains). The co-expression of both chains in the same cell is shown in the right panel. Value of scale bar = 75  $\mu$ m. (C): Levels of mouse  $\alpha$ D11

recombinant antibody from 1 and 2 family anti-NGF mice at 1<sup>st</sup> and 90<sup>th</sup> day, as measured in the serum (left) and encephalon (right). The dotted line

represents the detection value in the assay (0,1 ng/ml and 0,1 ng/mg, respectively). (D): Control transgenic mouse (transgenic for VH only, below) and 3 family anti-NGF mouse (above), at 17<sup>th</sup> day. The anti-NGF mouse is

smaller than the control. (E): Body weight of anti-NGF (family 1 and family 2) (left) and control mice (right).

Figure 3. Histological and molecular markers of the anti-NGF mouse A-H:

sections of basal telencephalon; I-L: hippocampus sections. A-B: ChAT staining. A. control mice; B: anti-NGF mice. C-D: cholinergic innervation

towards the frontal cortex. CP: caudate/putamen; FC: frontal cortex; GCC: genus of callosum corpus. C: control mouse; D: anti-NGF mouse. E-F: TrkA staining. E: control mouse; F: anti-NGF mouse. G-H: p75 staining. G: control mouse. H: anti-NGF mouse. I-L: ChAT staining. I: control mouse; H(L?): anti-

*Alfonso Bort*

NGF mouse. M and N sections: Timm staining of hippocampus "mossy fibres". M: control mouse; N: anti-NGF mouse.

Figure 4: Dilatation of cerebral ventricles Coronal sections of mouse encephalon stained according to Nissl method. The "aged" (15-18 month-old) 5 anti-NGF mice have lateral ventricles (VL) dilated in comparison to the control mice. It is observed atrophy of the septohippocampus (SHI) and lateral nuclei (LS) of the septum.

Figure 5: Atrophy of the cerebral cortex Coronal sections of mouse encephalon obtained at the basal telencephalon level. The frontal cortex in 10 transgenic mice (B) is atrophic in comparison to the control mice (A). The white bar indicates the cortex thickness measured in the same anatomical site. (C) Histogram comparing the atrophy grade in the transgenic (B) with respect to the control mice (A).

Figure 6. Atrophy of the hippocampus In comparison to those of the 15 transgenic mice (B) the hippocampi of control mice (A) are perfectly formed. (C) Histogram comparing the formation grade in the transgenic (B) with respect to the control mice (A).

Figure 7. Neuronal apoptosis Labelling of cortical apoptotic neurons obtained according to the TUNEL method. In the control mice (A) positive cells are not 20 observed, while in the anti-NGF mice (B) various nuclei with DNA fragmentation are observed.

Figure 8. Phosphorylation of the tau protein The transgenic mice show a remarkable positivity for the N-terminus segment of the tau (B), not

phosphorylated tau (D) and above all phosphorylated tau protein (F). In the control mice the labelling is absent (A, C, E). The labelling is localised mainly at level of the cerebral cortex (for example in E). The labelling for the N-terminus segment of the tau protein (B) is present in some hippocampus cells (arrows).

5

Figure 9. Deposition of  $\beta$ -amyloid protein plaques in the encephalon Both the anti-APP monoclonal and polyclonal antibody against the  $\beta$ -amyloid precursor protein show the presence of plaques in the *PARA-CINGULAR* cortex and *NEOSTRIATUM* in control mice (A) and in higher number and larger size in the anti-NGF transgenic mice (B). In both figures the arrows point to the  $\beta$ -amyloid plaques.

10

Figure 10 Western blot of encephalon extracts from anti-NGF and control mice The experiment was carried out using the anti-tubulin (A), phosphorylated AT8 anti-tau (B) and amyloid precursor anti-protein (C) antibodies. The blots are representative of 3 experiments wherein at least 3 control and 3 transgenic mice were used for each analysed age.

15

Figure 11 Accumulation of tau protein The insoluble fraction of the tau protein is accumulated in the encephalon of 5 month-old anti-NGF mice. The amount of the protein in the extracts was determined using the anti-tubulin antibody (A). The tissues were extracted in a sequential way using RAB Hi-salt (B), RIPA (C) buffers and 70 % formic acid (D). The tau insoluble fraction represented by the fractions extracted with RIPA and formic acid is accumulated in the anti-NGF mice but not in the extracts from the control

*Phospho-tau*  
*tau*

mice. The columns 1-2 and 3-5 columns relate to the control and anti-NGF mice, respectively.

Figure 12 Deposits of amyloid in the cerebral cortex of anti-NGF (a,a) and control mice (b) Several extracellular deposits observed in the cerebral cortex of the anti-NGF mice show a fibrillar nature. Scale bar in a, b = 75  $\mu$ m; c = 25  $\mu$ m.

Figure 13 Presence of stiff amyloid plaques Stiff amyloid plaques are observed in the white subcortical matter (A) and cerebral cortex (B) of 6 month-old anti-NGF mice. The plaque morphology in 15 month-old anti-NGF mice (C) is similar to that of the plaques observed in encephalon sections from Alzheimer patients (D). Scale bar in A = 150  $\mu$ m; in B-D = 75  $\mu$ m.

Figure 14 (a, b) Sections of the parietal and (c) ENTORINAL cortex of anti-NGF mice NFT antibody shows the presence of tangles (neurofibrillar tangles) in pyramidal cells (arrows) and in dystrophic neurites (arrow tip). d, in sections of control mice no labelling is observable. Scale bar = 25  $\mu$ m.

Figure 15 Neuron labelling by anti-NTF200 anti-tangles antibodies NTF antibody labels neurons in encephalon sections from both anti-NGF mice (G) and Alzheimer affected patients (H). Scale bar: 50  $\mu$ m.

Figure 16 Time progression of neuron labelling by anti-MAP2 antibodies In the 2 (a), 6 (C) and 15 (E) month-old control mice the labelling obtained using the anti-MAP2 antibody is spread in the dendrites lengthwise. In the anti-NGF mice a decrease in the number of labelled dendrites and re-distribution of the protein within the dendrites are observed. Such a decrease is progressive



and affects the encephalon cortex of the 2 (B), 6 (D) and 15 (F) month-old anti-NGF mice. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Figure 17 SILVER impregnation (E,F) The SILVER impregnation shows the presence of extracellular deposits (asterisks) associated to dystrophic neurites (arrows) and tangle like formations (arrow tip). Scale bar: 50  $\mu$ m

Figure 18 ChAT staining Choline acetyl transferase staining (ChAT) of the basal proencephalon of anti-NGF transgenic (c) and control mice (d). Scale bar: 200  $\mu$ m.

Figure 19 Tau protein labelling 1 month after the birth mAb AT8 labels all the neurons of both the ENTORINAL (A) and parietal cortex (B). In both the cortices the labelling decreases 1,5 months after the birth. 2 month after the birth the AT8 positive neurons are present only in the ENTORINAL cortex (D), while only few neurons are labelled in the parietal cortex (F). no neuron is labelled in the ENTORINAL cortex of control mice (E). 6 months after the birth all the neurons in both the ENTORINAL (G) and parietal cortex are AT8 positive. No positive neuron is observable in the cerebral cortex of same age control mice (I). Scale bar: 100  $\mu$ m.

Figure 20. Tau protein labelling 15 months after the birth AT270 (A, B) and AT8 (C, D) antibodies labels the pyramidal cells of the CA1-region of the anti-NGF mouse hippocampus. In the control mice the two antibodies labels only [AT270 (B) and AT8 (D)] axons. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Figure 21 Tau protein labelling The labelling obtained using mAb AT180 in anti-NGF mice increases with the age. Cerebral cortex 1 (E), 6 (F) and 15 (G)

months after the birth. The arrows point to the dystrophic neurons, the arrow tips detect non neuronal positive cells. Scale bar: 75  $\mu$ m.

Figure 22 mAb AT270 labelling in the cerebral cortex of anti-NGF mice 1 (A), 1,5 (B) and 2 (C) months after the birth. No difference is observable 5 compared to the control mice. 6 months after the birth in the anti-NGF mice labelling in the cortical neurons (D) is observed. The number of the labelled neurons increases in the anti-NGF mice 15 months after the birth. 6 and 15

months after the birth the control mice do not show positive neurons in the cerebral cortex (F). Scale bar: 100  $\mu$ m.

10 Figure 23 Muscular atrophy: Cross-sections of muscles collected from control and anti-NGF mice. Staining: haematoxylin eosine. Rectus medial M. of control (A) and transgenic (B) mouse leg. Gastrocnemius M of control (C) and transgenic (D) mouse. Anterior tibial M. of control (E) and transgenic (F) mouse.

15 Figure 24 Amyloid deposition in the muscle. The Congo Red staining detects the presence of amyloid deposits in transgenic (B) compared to control (A) mouse muscles.

Figure 25 Amyloid deposition in the muscle The immunoreactivity against the  $\beta$ -amyloid protein in the muscles of "aged" control mice (A) is completely 20 absent. In the anti-NGF mice (B) a labelling increase, revealed by the brown precipitate, at the level of the sarcolemma and cytoplasm of the myofibres is observed.

Figure 26 Phosphorylation of the tau protein in the muscle The

immunoreactivity against the phosphorylated tau protein in the muscles of "aged" control mice (A) is completely absent. In the anti-NGF mice a labelling increase, revealed by the brown precipitate, at the level of the sarcolemma and cytoplasm of the myofibres (B) is observed.

5 Figure 27 Macrophage infiltration in the muscle Longitudinal (A) and cross (B) sections of "aged" anti-NGF transgenic mouse muscles. Among the myofibres the presence of immune type cells, as macrophages (arrows) is observed.

Figure 28 Position of the nuclei in the myofibres of the anti-NGF mice In 10 some myofibres of "aged" mice the presence of nuclei in the middle of cell (arrows) rather than in the periphery is observed.

Figure 29 Behavioural test for anti-NGF mice A) Nociceptive test for anti-NGF transgenic and control mice. B) "Open field" test. C) "Rotarod" test. D) "Spatial orientation" plots for anti-NGF (n = 10, filled circles) and control (n = 15, empty circles) mice in the radial labyrinth test. The vertical bars represent the standard error. The number of entries needed to find all the four meals is plotted against the time. E) Test for the conservation of the acquired functions, carried out on 35<sup>th</sup> day after the starting of the learning step. F) Transfer test of the acquired notions, carried out after the conservation test.

20 Figure 30 Test for the discrimination of the objects The test for the discrimination of the objects shows a defect in the differentiation among the objects in the anti-NGF mice, \* P < 0,03.

Example 1 Production of anti-NGF transgenic mice and molecular

*M. Bernanki Boffy*

characterisation thereof

Transgene preparation

Recombinant chimeric antibody was obtained by assembling the sequences of DNA corresponding to the variable murine regions of the Mab  $\alpha$ D11 anti-5 NGF monoclonal antibody (Ruberti et al., 1993) (Genebank, access numbers: L17077/NID g310168, heavy chain and L17078/g310169, light chain, respectively) with the DNA corresponding to the constant regions of the human light K and heavy  $\gamma$ 1 chains. The transcription units corresponding to the chimeric light and heavy chains (figure 1A), containing 10 at 5' the Cytomegalovirus precursor and at 3' the polyadenylation site of the bovine growth hormone (bGH), cloned into the expression vectors pcDNAI-NeoVK $\alpha$ D11HuCK and pcDNAI-NeoVH $\alpha$ D11HuC $\gamma$ , respectively, were extracted using KpnI-Apal and KpnI-XbaI restriction enzymes, respectively, purified and injected separately or in combination in the pro-nucleus of 15 mouse B6SJL strain egg cells fecundated according to standard methods; for example see Allen et al., 1987. Two transgenic parents for the light (A and B family, low and high producer, respectively), two for the heavy (C and D family, low and high producer, respectively) and three for both (double transgenic) antibody chains were obtained, respectively. The latter parents, 20 which express the antibody at a level of about 50 ng/ml, are unable to reproduce and therefore are unsuitable for the continuation of the study.

The molecular analysis of the transgenic parent mice (A, B, C and D families) was carried out by PCR (Figure 1C) or Dot Blot (Figure 1D) on genomic DNA





extracted from tail biopsies as described in Piccioli et al., 1995. Messenger RNA was extracted according to Chomcynski and Sacchi method, 1987, at different times from the birth and was analysed by RNase-protection.

#### Preparation of the anti-NGF mouse

5 In order to generate animals transgenic for the functional antibody, consisting of both chains, the two parents transgenic only for the light (parents A and B) or only for the heavy (parents C and D) chains were cross-bred in different combinations (Figure 1B). Only the cross-breeds of A with D and B with C parents, which result in 1 and 2 family of double transgenic 10 heterozygotic mice, respectively, are fertile and generate viable animals with an over 80 % efficiency.

#### Characterisation of the anti-NGF mouse

The levels of the functional antibody of either light or heavy chains of the transgenic animals were measured by ELISA assays (Monlar et al., 15 1998), using a biotin labelled human anti-IgG secondary antibody, after 1:10 dilution of serum or encephalon homogenates (Piccioli et al., 1995) with PBS-2 % powder milk.

The levels of the anti-NGF chimeric antibody for 1 and 2 families, measured in the serum and encephalon tissue of adult animals (90 day-old) 20 are higher than 100 ng/ml and 100 ng/mg, respectively. The 2 family values are about two times than 1 family. Whereas soon after the birth (1 day) the antibody levels are lower than the detection limit of the assay (0,1 ng/ml in the serum and 0,1 ng/ml in the tissues) (Figure 2C).

*D. Beltramini*

The mRNAs specific for the chimeric VH and VK chains are expressed in different tissues among which the encephalon, kidney, heart, muscle, liver and testicles. The mRNA levels of both chains in the adult (90 day old) are about six times higher than in the newborn animal (1 day) (Figure 1E).

5 Therefore it results that the expression increase (1-2000X) of the anti-NGF functional antibody observed in the heterozygotic animal (double transgenic) is only partially determined by the increase of the mRNA expression levels.

Organ sections of anti-NGF mice are therefore fixed by intracardiac 10 perfusion of 4 % paraformaldehyde in PBS, collected on a slide, preincubated in 10 % foetal serum and 5 % BSA, then used to detect by immunohistochemistry the expression of different antigens: particularly the co-expression of the light and heavy chains of the anti-NGF antibody were made detectable by anti-human light or heavy chain biotinylate 15 (Amhersham), detected by HRP or AP-conjugated avidin-biotin(Elite Standard kits, Vector). The localisation at cerebral level is showed in figure 2A, while in figure 2B is revealed by immunohistochemistry that the two chains of the chimeric antibody are co-expressed frequently.

Example 2 NGF phenotype knockout in anti-NGF transgenic mouse

20 The characterisation of the anti-NGF mouse phenotype was carried out at different levels: macroscopic, histological and molecular. At macroscopic level, during the first 3-4 life weeks the anti-NGF transgenic mice do not show remarkable abnormalities, except an about 25 % decrease

*Al Mervat Boff*

of body weight compared to corresponding control mice (Figure 2 D and E).

Usually the experiments were carried out on anti-NGF transgenic animal of numerosity group n = 6 with anti-NGF antibody levels from 50 to 300 ng/ml; as controls transgenic mice were used only for the antibody heavy chain (VH)

5 (parent C or D), therefore not expressing the functional antibody.

At histological and molecular level the following differences, compared to normal mice, were observed, district by district: 1) central and peripheral nervous system, 2) muscular system and 3) spleen.

1) Central and peripheral nervous system

10 IN THE BASAL TELENCEPHALON AN UP TO 57 % REDUCTION IN THE NUMBER OF ACETYLTRANSFERASE-POSITIVE NEURONS (CHAT) AND A REDUCTION OF THE EXPRESSION LEVEL WERE OBSERVED, WHILE IN THE HIPPOCAMPUS AN UP TO 70 % REDUCTION OF NEURONS IS OBSERVABLE. IN ADDITION THE CELLS APPEAR MORPHOLOGICALLY SMALLER. AS FOR THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM THE  
15 UPPER CERVICAL GANGLIA ARE UP TO 45 % SMALLER THAN CONTROL; ALSO IN THIS CASE THE CONSTITUTING CELLS APPEAR MORPHOLOGICALLY SMALLER (FIGURE 3 A-B). THE MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL ASPECT OF THE MOUSE ENCEPHALON EXPRESSING THE ANTI-NGF RECOMBINANT ANTIBODY WAS ANALYSED IN  
20 TRANSGENIC 15-18 MONTH-OLD MICE ("AGED" ANIMALS) IN COMBINATION WITH THE PRESENCE OF PHENOTYPIC LABELS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES, AS FOLLOWING: "NEURONAL LOSS" AND APOPTOSIS, SYNTHESIS OF CHOLINE-ACETYLTRANSFERASE (CHAT) (FIGURE 3 A, B), DETERMINED BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY WITH ANTI-CHAT ANTI-SERUM (CHEMICON), RATIO OF

*M. Chodounská*

PHOSPHORYLATED TO NON PHOSPHORYLATED TAU PROTEIN (MEASURED BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY OR WESTERN BLOT WITH SPECIFIC ANTISERA), PRESENCE OF  $\beta$ -AMYLOID PROTEIN AND PRECURSOR OF PHOSPHORYLATED AMYLOID PROTEIN, APP (AMYLOID PRECURSOR PROTEIN), (DETERMINED BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY WITH SPECIFIC ANTISERA). THE NUMEROUS OF THE GROUPS USED FOR THE EXPERIMENTS, EXCEPT WHERE OTHERWISE INDICATED, WAS N = 6 TRANSGENIC ANTI-NGF WITH TRANSGENIC ANTI-NGF ANTIBODY LEVELS FROM 50 TO 300 NG/ML; AS CONTROL WERE USED MICE TRANSGENIC ONLY FOR THE ANTIBODY HEAVY CHAIN (VH) (PARENT C AND D), THEREFORE NOT EXPRESSING THE FUNCTIONAL ANTIBODY.

10 The obtained results can be summarised in the following points:

- (a) Dilatation of the cerebral ventricles (Figure 4). The severity of the ventricular dilatation is associated to a remarkable atrophy of the cerebral cortex (Figure 5) and hippocampus (Figure 6).
- (b) Neurodegeneration and neuronal loss. It is possible to visualise apoptotic 15 cells in more severely damaged mice at cerebral level as pointed out by TUNEL method (Figure 7). Apoptotic phenomena indicate a progressive cell die.
- (c) Decrease of the choline-acetyltransferase (ChAT) synthesis, (Figure 3 A-B and I-L), particularly in the basal telencephalon. Namely no neurons 20 positive for this label in the nucleus of the medial septum is observed in analysed animals. The expression, in comparison to that observed in younger (2-3 month-old) mice, is decreased. A lower expression is also observed for the two NGF-receptors, TrkA (Figure 3 E-F) and p75, in the

*HL Hernandez Busto*



basal telencephalon (Figure 3 G-H). Particularly the decrease for the TrkA-positive is more remarkable than for p75-positive cells.

(d) Increase of the tau protein phosphorylation (Figure 8). Using antibodies specific for tau protein N-terminus segment [Alz-50 (Wolozin et al., 1986)] (Figure 8A and 8B), against the not phosphorylated tau protein [anti-Tau 1 (Grundke-Iqbali et al., 1986)] (Figure 8C and 8D) and against the same epitope of the phosphorylated tau protein [mAB AT-8 (Greenberg and Davies, 1990)] (Figure 8E and 8F), by immunohistochemistry a remarkable generalised increase of the tau synthesis, mainly of the phosphorylated component thereof, was detected. The used antibodies labels cortical neurons which present a modified morphology, evidencing the presence of "neuropil threads", "ghosts" and "tangles". The labelling against the phosphorylated form of tau protein evidenced a remarkable increase of this protein also in the microglia cells which are activated in neurodegenerative processes. Antibodies against the  $\beta$ -amyloid protein and amyloid precursor protein [APP (Glenner and Wong, 1984)] evidence the presence of several plaques in both the PARACINGULAR cortex and NEOSTRiatum (Figure 9A and 9B). In a further experiment the progressive increase of the hyperphosphorylated tau content in the encephalon of the anti-NGF mice was evaluated by biochemical analysis (Western blot analysis). The results were normalised for the total protein content using an antibody against tubulin (Figure 10A). The western blot analysis carried out using the antibodies against hyperphosphorylated tau (PHF-1 and AT-8) evidenced

*Dr. M. Mazzanti  
Busto*

that an increase of the phosphorylated tau content is present in 2 month-old animals and the tau content reaches a plateau 6 months after the birth (Figure 10B). The biochemical analysis of the amyloid precursor protein evidenced that the content of this protein increases from 6 months after the birth (Figure 10C). Furthermore 15 months after the birth two bands, corresponding to 120 kDa and 25 kDa, respectively, are observed (Figure 10C).

The presence of insoluble aggregates of tau protein was evaluated in 15 month-old anti-NGF mice. The encephalon was extracted sequentially using buffers with different extraction activity. The experiments evidenced that in the anti-NGF mice most hyperphosphorylated tau protein is insoluble (Figure 11).

Therefore the modification at the protein level of the tau cytoskeleton precedes the modifications observable at the amyloid protein level. Further the experiments evidence the presence of insoluble tau, which can be part of that component forming PHFs (paired helical filaments) which constitute the intracellular tangles and extracellular deposits in the Alzheimer disease. The results show a modified processing of the amyloid protein too.

The presence of amyloid plaques was detected using an antibody against the amyloid precursor protein. The experiments were carried out using both immunohistochemical and Western blot techniques (see above). The results showed that, 15 months after the birth, amyloid plaques are present in both the cerebral cortex and hippocampus of anti-NGF mice (Figure 12). These

*M. Abbracchio Dott.*

plaques cover a significant part of the *ENTORINAL* cortex surface, the percentage values being 21 % of the surface compared to 0,5 % in the control mice. In other regions of the cerebral cortex the percentage of the surface covered by amyloid plaques is 10 % and 0,1 % in the anti-NGF mice 5 and control mice respectively. The values are 4 % and 0,1 % in the hippocampus of the anti-NGF and control mice, respectively.

The plaque distribution and morphology thereof in the anti-NGF mice are entirely comparable to those observed in sections of patients affected by Alzheimer's disease (Figure 13). From above data it can be concluded that in 10 the anti-NGF mice an high extracellular deposition of amyloid as plaque aggregates similar, as for morphology and distribution, to those observed in human encephalon sections of patients affected by Alzheimer's disease.

(e) Presence of intracellular tangles in neurons of anti-NGF mice. The presence of intracellular tangles in encephalon sections of anti-NGF mice 15 was showed using a mAB NFT200 antibody able to detect tangles in encephalon sections of Alzheimer affected patients. mAB NFT200 labelled many neurons distributed throughout the encephalon of anti-NGF mice (Figure 14a-c) but not in control animals (Figure 14d). The antibody detected the presence of intracellular inclusion in dystrophic neurites too. In Figure 15 20 it is possible to compare the distribution of tangles in anti-NGF mice and in encephalon sections of Alzheimer patients.

The mAB NFT200 antibody reveals, in the encephalon of anti-NGF mice, aggregates similar to those observed in sections of human encephalon. This

*Alzheimer's  
Disease*

feature, indispensable to confirm the diagnosis of the Alzheimer disease in humans, was never detected up to now in other animal models partially reproducing this pathology.

(f) Modifications of the distribution of the protein associated to MAP-2 microtubules. The protein associated to the microtubules (MAP-2) is part of the multiplicity of the proteins forming the cytoskeleton of neurons. The modifications of said protein were detected using the anti-MAP-2 antibody. 1 and 1,5 months after the birth the observed distributions of the MAP-2 protein in the cortex neurons of anti-NGF transgenic and control mice were similar. 2 months after the birth in the control mice the MAP-2 labelling is distributed throughout the dendrites lengthwise (Figure 16A). At this age in the anti-NGF mice a decrease in the number of labelled dendrites and a labelling re-distribution in the dendrite lengthwise are observed (Figure 16B). 6 and 15 months after the birth the number of dendrites is still decreasing in the anti-NGF mice. In the dendrites of these animals a clear labelling re-distribution is also observed, which is localised in the proximal zone of the dendrites (Figure 16D,F). In the same age control mice the MAP-2 labelling is still distributed throughout the dendrites lengthwise (Figure 16C,E).

From these results it can be deduced that the NGF deprivation determines a modification in the distribution of the cytoskeleton proteins of the cortical neurons. This modification could be part of the neurodegenerative phenomena leading to the occurrence of the Alzheimer disease.

(g) Silver impregnation of anti-NGF mice encephalons. For these



experiments a silver impregnation technique (Bielschowsky method), previously used to detect extracellular neurite plaques and tangles in encephalon sections of Alzheimer patients, was used.

In the anti-NGF-mice this technique allowed to detect the co-existence of 5 dystrophic neurites and extracellular fibrous material in the form of plaques (Figure 17E,F). These aggregates are clear in 6 and 15 month old mice.

The silver impregnation is an histological technique which allowed, independently from immunohistochemical techniques, to detect the presence of plaques consisting of extra-cell deposited material and dystrophic neurites.

10 In addition this technique allowed to detect the co-existence of these two modifications. The attempts to detect these modifications in other animal models for the Alzheimer disease failed.

(h) Time progress of the neuropathology in anti-NGF mice. Experiments to evaluate the occurrence of modifications in the different phenotype markers 15 were carried out. This time progress is summarised below and in table 2:

1. The decrease of cholin-acetyltransferase(ChAT)-positive neurons, previously described (Ruberti et al., 2000), continues 2 months after the birth and reaches a plateau 6 months after the birth whereupon a 90 % reduction in the number of positive neurons in the medial septum (Figure 18C,D) is 20 observed.

2. The determination of the somadendritic distribution of the tau protein in hyperphosphorylated form was carried out by different antibodies and, in the anti-NGF mice, showed as follow:

*Dr. Alessandra Rossi*

- 2 months after the birth only the entorinal cortex presents modification detected by mAB AT8 (Figure 19),
- these modifications extend to other regions of the cerebral cortex and hippocampus (Figure 19 and Figure 20) from 6 months after the birth,

5 - these modifications are detected also by other antibodies, different from AT8, i.e. AT180 and AT270 mABs.

3. The AT8 antibody, used together with extraction techniques, shows that the most tau protein extracted from the anti-NGF mice encephalon is insoluble.

10 4. The cytoskeleton modifications concern not only the protein but also MAP-2 protein and start 2 months after the birth.

5. The tangle-like inclusions are present only 15 months after the birth, whereas the dystrophic neurites are detected already 6 months after the birth.

15 6. The DNA fragmentation is observed only 15 months after the birth. In conclusion the anti-NGF mice present a time progress of the neurodegeneration starting from the cholinergic deficit and modification of some cytoskeleton proteins. The spatial progress of the pathology is similar to what observed in encephalon from Alzheimer patients.

20 Table 2 follows.

Table 2

			Age (months)				
		cerebral zones	1	1,5	2	6	15
	phenotypic markers						
	ChAT decrease		-	-	+	++	++
25	Presence of hyperphosphorylated						

	tau protein in somadendritic compartment					
	AT180	Entorinal cortex	-	-	-	++
5		Parietal cortex	-	-	-	++
		Occipital cortex	-	-	-	++
		Hippocampus	-	-	-	-
	AT270	Entorinal cortex	-	-	-	++
		Parietal cortex	-	-	-	++
10		Occipital cortex	-	-	-	++
		Hippocampus	-	-	-	+
	AT8	Entorinal cortex	-	-	+	++
		Parietal cortex	-	-	-	++
		Occipital cortex	-	-	-	++
		Hippocampus	-	-	-	++
15	Insoluble tau	nd	nd	nd	nd	++
	MAP-2 abnormal subcellular localization	-	-	+	++	++
	Neurofibrillar tangles	-	-	-	-	++
	Amyloid plaques	-	-	-	+	++
20	Inclusions detected by silver impregnation	-	-	-	+	++
	Dystrophic neurites*	Entorinal cortex	-	-	-	++
		Parietal cortex	-	-	-	++
		Occipital cortex	-	-	-	++
25		Hippocampus	-	-	-	-
	DNA fragmentation	Cerebral cortex	-	-	-	+
		Basal proencephalon	-	-	-	-
30	determined.	+ means a qualitative measure of each phenotypic marker, ND, not determined.				

\* as detected by silver and immunohistochemical impregnation by

hyperphosphorylated anti-tau antibodies and "tangles".

Therefore the analysis of these mice showed that the neurodegenerative pathology at the encephalon level is preceded by an early (2 months after the birth) tau hyperphosphorylation and amyloid deposition in the back or lower limb skeletal muscles. It is to be pointed out that the association of Alzheimer disease with inclusion body myositis in humans is already known.

*Alzheimer's  
Disease  
in Mice*

*Dr. J. D. Carlson*

In summary the transgenic mice expressing the anti-NGF antibody resemble at the level of the Central and Peripheral Nervous System many pathological modifications typical in neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer disease.

5           2) Muscular system

Mice evaluated (n = 15), from 45 to 60 days after the birth, at a macroscopic level stagger, due to an abnormal position of the rear legs and support of toe tips and often present backbone scoliosis. The anatomical analysis shows a reduction of the back longitudinal skeletal muscles, flexor and adductor of the rear limbs, feature not observable in other muscles, for example in the corresponding muscles of the front limbs. Some deficits were better characterised and detailed as follow:

a) muscular dystrophy, characterised from the morphological and histological point of view. The atrophy of the muscular fibres is present, in all 15 the considered animals (n = 15), for the muscles which allow the movements of the backbone and aid the stability of the connections of each other vertebra (longest muscle for the backbone and inter-vertebral muscles, respectively). Further in all the animals the reduction of the diameter of the muscular fibres (up to 50 %) is observable in the 70 % of the fibres: in the 20 adductor (leg medial rectus, large and small adductor), leg flexor (outer, medial and inner ischiotibial) and metatarsus extensor (gastrocnemius and soleus muscles). On the contrary the atrophy is not present at the level of the metatarsus flexor muscles (front tibial and phalanx extensor muscles) and it





is less evident in the front limb extensor muscles (brachial triceps muscle). All these differences are showed in Figure 23. Further every dystrophic muscular fibre show also a remarkable vacuolization (Figure 23B-E) and a more intense staining by haematoxylin/eosine.

5 b) scoliosis, in some animals (n<6), in some cases associated with an incomplete development of the vertebral bodies.

c) muscular atrophy, typified at molecular level as follow:

10 c.1) re-expression of the low affinity NGF receptor (p75). It is particularly clear in some muscular cells exhibiting modifications in the distribution of nicotine receptors at the level of the neuromuscular junctions.

c.2) decrease in the number of the nervous peptidergic endings at the level of the neuromuscular junctions. This decrease was detected by antibodies against the calcitonin gene-related peptide [CGRP (Gibson et al., 1984)].

15 c.3) absence of the aggregation of the acetylcholine receptors in the plasmatic membrane of the muscular cells and detected by the irreversible binding of alfa-bungarotoxin (Changeux, 1991), caused by the failed innervation of the muscular fibre. The distribution of the muscular cells exhibiting such a modification gives the muscles of the transgenic mice a 20 characteristic mosaic pattern.

c.4) increase of the dystrophin immunoreactivity detectable in the above described cells exhibiting molecular modifications by immunohistochemistry using D-8043 antibody (Sigma). The dystrophin is a

*J. M. Bellok*

protein of the cytoskeleton muscular cell involved in the contraction and aggregation of the cholinergic receptors. It is already known that an increase in the dystrophin synthesis occurs concurrently with the muscle denervation.

5 c.5) ATPase modified metabolism due to the lack of the nerve trophic effect.

c.6) remarkable deposition of amyloid substance, detected by a characteristic ring cytoplasmic staining by Congo Red (Figure 24A-B). The presence of amyloid and particularly  $\beta$ -amyloid was detected also by immunohistochemistry against the  $\beta$ -amyloid precursor protein (Figure 25A-10 B) in aged mice.

c.7) phosphorylated tau protein in the muscles of the aged mice (age from 15 to 18 months). Figure 26A-B.

c.8) presence of various muscular fibres with nuclei located in the middle rather than below the sarcolemma in aged anti-NGF mice (Figure 28).

15 Histological assays detects an infiltration of immune type cells, probably macrophages, among the muscular fibres (Figure 27A-B).

The presence of deposits of the  $\beta$ -amyloid and hyperphosphorylated tau protein and in addition nuclei located in the middle region and macrophages infiltration, is related to what observed in inclusion body 20 myositis (IBM), a pathology strictly correlated with the Alzheimer disease.

### 3) Spleen

At anatomical level the localisation of the sympathetic innervation is distributed in the germinal centre and marginal zone, rather than in the

*M. Bazzucchi - Bressana*

proximity of the central artery, as in the control mice. The recover of the viable splenocytes is reduced by one order of magnitude ( $2-3 \times 10^6$  vs.  $2-3 \times 10^7$  of the controls) in the anti-NGF transgenic mice, as observed by flow cytometry. Functionally it can be observed a reduction of the number of the IgG positive lymphocytes and a fair increase of the IgD positive lymphocytes, as measured after incubation (30', 4°C) of the splenocytes with FITC anti-IgG (Sigma), IgM, IgA, IgD mouse (Pharmingen) labelled primary antibodies and analysis by Coulter Epics Elite Esp Flow Cytometer at 488 nm. Furthermore in the red pulp can be detected DNA fragmentation indicating apoptosis according to the reduced recover of viable splenocytes.

Example 3 Analysis of the behaviour of the ant-NGF transgenic mice

The analysis was carried out on 12-18 month old animals (n = 6), selecting animals without evident gait anomalies. The following anomalies, resumed in Figure 29, with respect to the control animals were detected:

15 - increase of the latency time for the heat sensitivity, changed from 3" for the control mice to 16" for the anti-NGF mice, as measured according to the hot plate nociceptive assay, already described in Eddy et al., 1953;

20 - spatial orientation: the anti-NGF mice exhibit a higher number of errors during the working memory learning over first three days, in fact the learning plots are significantly different (two way RMANOVA test,  $p<0,05$ ), however the final learning level is not different from that of the control mice, as measured by the radial labyrinth test, carried out as follow: the animals were located in 8 arm radial labyrinth and free to feed themselves for 5' and

*P. Mazzanti Bok*

familiarise with the labyrinth over two days. For the test the same four arms were filled with food every day; at the beginning of each test the mice were left at the centre of the labyrinth, free to explore it: the test was terminate if the food was finished or 25 entries were observed into the arms of the 5 labyrinth: the tests were repeated twice a day over 14 days, made mistakes (short and long term memory mistakes) and taken times being measured. The starting and final learning levels were evaluated using the average of the mistakes made over the first and last three days.

- ability in maintaining the acquired notions. The anti-NGF mice do not 10 maintain the acquired notions at 31<sup>st</sup> day from the learning step, as measured by the same radial labyrinth test. The learning plots were compared with the two way ANOVA test (treatment x time) and the significance of the differences evaluated by T-test.

- deficit in the ability of learning transfer into other situation, as 15 measured by the radial labyrinth test, using food filled exits different from those used in the learning step. The anti-NGF mice exhibit a clear learning deficit ( $p < 0,01$  in two way RMANOVA test) in comparison to the control mice, also after 5 learning days. The differences resulted mainly from a higher number of short term memory errors (T-test,  $p < 0,006$ ).

20 - short term memory test (object discrimination test). According to this test the mice explored 2 white cubes over 10 minutes. Then one cube was coated with white and black chess painted paper. One hour after the end of the first trial the mice were allowed to come again in contact with the cubes

*R. Bernatko*



and explore them over additional 10 minutes. The anti-NGFtransgenic mice were not able to distinguish between the two cubes coated with differently coloured papers (Figure 30). Therefore the anti-NGF mice show a decrease in the short term memory, not being able to memorise and distinguish  
5 between the two differently coloured cubes.

Example 4 Reversibility of the muscular dystrophy in anti-NGF mice by NGF local administration

All the experiments were carried out on 45 day old mice, when the serum level of the anti-NGF antibody is reaching the highest level (observed  
10 60 days after the birth). The NGF was administered locally by different methods: (a) by intramuscular injection of NGF, (b) by a viral recombinant vector (adenovirus) encoding for NGF cDNA or (c) by the implant of NGF secreting fibroblasts. All the administration ways included the injection or implant in the gastrocnemius muscle, one of the skeletal muscles affected by  
15 muscular dystrophy. The injections and implants were carried out on the right leg, while the gastrocnemius muscle of the left leg was used as control. A) NGF was injected as pellet, consisting of diazocellulose mixed NGF in borate buffer at pH 8,0 for 72 hours and following neutralisation by glycine saturated solution (Hendry, 1982). This method allows the exact localisation and slow  
20 release of this neurotrophin. Different NGF concentrations were used, comprised in the range from 100 µm and 2 mg for each animal. For the administration of cDNA according the method b), 10 µl of the adenoviral vector solution corresponding to  $10^7$  pfu/ml were injected in the

*One December 2006*

gastrocnemius muscle. In the control animals a recombinant adenovirus containing Escherichia coli Lac Z reporter gene was injected. Both in this and in fibroblast injection experiment (see later) the NGF production was constant at least over one month, allowing the phenotype reversibility to be observed.

5         According to method c) fibroblasts genetically modified to secrete NGF by infection with a retroviral vector encoding for cDNA of this neurotrophin, according to the method described by Gage et al. (1990), were implanted in the muscle. This allowed to obtain an in situ NGF production equal to 100 ng/10<sup>6</sup> cells/day. The fibroblasts were injected after re-suspension in sterile 10 physiological saline at a 2 x 10<sup>5</sup> cells/µl concentration. The injection volume was 10 µl/animal.

To verify the effect of the NGF administration the animals were sacrificed 7, 15 and 30 days after the injection. The injected and contralateral muscles were collected and analysed by histological and immunohistochemical techniques to verify the attenuation of the dystrophy and the restoration of usual innervation. Thus it was verified that in all the 15 injected animals the values of the muscular fibre diameter were again similar to those of the control animals. Furthermore their morphology and cholinergic and peptidergic innervation re-assumed an usual appearance.



20         As to the restoration of the cholinergic phenotype in the basal telencephalon two different approaches were used. In a first set of experiments after the anaesthesia the equipment of NGF releasing minipumps was used. A rubber capillary tube was inserted in the lateral

ventricle and then connected by means of an osmotic minipump to a "pocket" of the subcutaneous layer. This pump was filled by NGF (30 – 100 µg) diluted with Ringer-Locke physiological saline. Another group of animals was treated by an implant of fibroblasts genetically modified to secrete NGF. The 5 fibroblasts were injected in the lateral ventricle at a  $2 \times 10^5$  cells/µl concentration. The injection volume was 1,5 µl/animal. This second method allowed to verify, by E.L.I.S.A., the constancy of the NGF production over 4 weeks after the implantation. The analysis of the cholineacetyl transferase expression (ChAT) in the nuclei of the basal telencephalon and the analysis 10 of the behaviour of these mice allowed the phenotype reversibility to be observed in the anti-NGF mice at the level of the cholinergic system.

As a whole these results confirm that the NGF administration is able to correct the muscular and cholinergic deficit observed in the anti-NGF mice.

#### BIBLIOGRAPHY

15 - Allen, ND, et al. (1987) In Mammalian development: A practical approach, M. Monk, ed. (Washington DC: IRL Press) pp 217-234.

- Baron P., et al. (1994) Muscle and Nerve 17: 276-284.

- Boissiere F, et al. (1997). Exp Neurol 145:245-252.

- Borchelt DR, et al. (1997). Neuron 19:939-945.

20 - Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999). Am J Pathol 154:255-270.

- Changeux JP, Duclert A,, Sekine S (1992). NY Acad Sci 657:361-378.

- Chomcynski, P, and Sacchi, N (1987). Anal. Biochem. 162:156-159.

- Citron M, et al. (1997). *Nat Med* 3:67-72.
- Connor B, Dragunow M (1998) *Brain Res Rev* 27:1-39.
- Crowley, C, et al. (1994). *Cell* 76:1001-1011
- 5 - Davies AM (1992). In *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*, S. Scott, ed. (Oxford. Oxford University Press), pp 194-214.
- Eddy, NB and Leimbach, D (1953) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107:385-396.
- 10 - Eide F, Lowenstein DH and Reichardt LF (1993) *Exp. Neurol.* 121:200-214.
- Fukuchi K, et al. (1998) *Am J Pathol* 153:1687-1693.
- Gage, FH, et al. (1990). *Prog Brain Res.* 86:205-217
- Games S, et al. (1995). *Nature* 373:523-527.
- Gibson SJ, et al. (1984). *J. Neurosci.* 4:3101-3111.
- 15 - Glenner GC, Wong CW (1984), *Biophys Biochem Res Commun* 120:885-890.
- Goedert M (1993). *Trends Neurosci* 16:460-465.
- Gotz J, et al. (1995). *EMBO J* 14:1304-1313.
- Greenberg SG, Davies P (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5827-
- 20 - 5831.
- Grundke-Iqbali I, et al. (1986). *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913-4917.
- Holcomb L, et al. (1998). *Nat Med.* 4:97-100
- Hsiao K, et al. (1996). *Science* 274:99-102.





- Irizarry MC, et al. (1997b). *J Neurosci* 17:7053-7059.
- Jin LW, et al. (1998). *Am J Pathol* 153:1679-1686.
- Kalaria RN (1993). *Brain Pathol* 3:333-347.
- Levi-Montalcini R and Brooker (1960). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 46:384-5 391.
- Luxenberg JS, et al. (1987). *Neurology* 37:1135-1140.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (1993). *Trends Biochem Sci* 18:480-483.
- Mizutani T, et al. (1990) *Acta Neuropathol (Berl)* 80:575-580.
- Molnar, M. et al. (1998). *Eur. J. Neurosci.* 10:3127-3140.
- 10 - Piccioli, P. et al. (1995). *Neuron* 15:373-384.
- Ruberti, F., Bradbury, A. and Cattaneo, A. (1993). *Cell. Mol. Neurobiol.* 13:559-568.
- Schnell L. et al. (1994). *Nature* 367:170-173.
- Selkoe DJ (1994). *Curr Opin Neurobiol* 4:708-716.
- 15 - Snider WD and Johnson EM Jr (1989). *Ann. Neurol.* 26:489-506.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. (1997). *Proc. Natl Acad Sci USA* 94:13287-13292.
- Wolozin BL, et al. (1986). *Science* 232:648-650.
- Wong TP, et al. (1999). *J. Neurosci.* 19:2706-2716.

*D. Melkumyan*

## CLAIMS

1. Non-human, transgenic, mammalian animal for an anti-NGF (NGF: Nerve Growth Factor) antibody.
2. Animal according to claim 1 wherein the anti-NGF antibody blocks the NGF binding to the receptors thereof.
3. Animal according to claim 1 able to express the anti-NGF antibody only in the adulthood.
4. Transgenic animal according to claim 3 able to express the anti-NGF antibody in serum at measurable levels from 50 to 500 ng/ml.
5. Animal according to claim 1 wherein the anti-NGF antibody is a monoclonal anti-NGF  $\alpha$ D11 antibody.
6. Animal according to claim 5 wherein the  $\alpha$ D11 antibody is a  $\alpha$ D11 chimeric antibody.
7. Animal according to claim 6 wherein the chimeric antibody is humanised chimeric antibody.
8. Animal according to claim 1 belonging to murine genus.
9. Animal according to claim 8 belonging to BS6JL strain.
10. Transgenic animal according to claim 1 expressing at least one of the pathologies included in the following group:
  - 20 - neurodegenerative syndromes
  - muscular atrophy/dystrophy
  - modification of the lymphocytic sub-populations and cellular death in the spleen.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dr. Christopher R. Bell".

11. Transgenic animal according to claim 10 wherein the neurodegenerative syndrome exhibits at least one of the anatomical, histological, molecular or phenotypic markers included in the following group:

- dilatation of the cerebral ventricles,
- 5 - atrophy of the cerebral cortex and/or complete disappearance of the hippocampus;
- neuronal loss or apoptosis,
- deposition in CNS of plaques of  $\beta$ -amyloid protein,
- hyperphosphorylation of the tau protein,
- 10 - neurofibrillar pathology.

12. Animal according to claim 11 wherein at least one of anatomical or histological markers is included in the following group:

- dilatation of the cerebral ventricles
- atrophy of the cerebral cortex
- 15 - neuronal loss

are present ad a level higher than that of the animals used as control.

13. Transgenic animal according to claim 10 wherein the muscular atrophy/dystrophy is associated at muscular level to at least one of the anatomical, histological, molecular or phenotypic markers included in the 20 following group:

- deposition of plaques of  $\beta$ -amyloid protein,
- hyperphosphorylation of the tau protein,
- infiltration of inflammatory cells.

*M. Chauvelot Bost*

14. Transgenic animal according to claim 13 wherein the occurrence of the tau hyperphosphorylation and/or amyloid deposition in the back or lower limb skeletal muscles is premature compared to the occurrence of neurological markers.

5 15. Monitoring method of the occurrence of the tau hyperphosphorylation and/or amyloid deposition in the back or lower limb skeletal muscles of a subject for an early diagnosis of neurodegenerative diseases.

16. Cells derived from the transgenic animal according to claim 1.

17. Use of the cells according to claim 16 for the selection of molecule 10 effective in neurodegenerative pathologies.

18. Use of the cells according to claim 16 for the selection of molecules active in muscular diseases.

19. Method for the preparation of a non-human transgenic according to claim 1 comprising essentially the steps of:

15 a) preparation of a non-human animal parent line transgenic for the light chain of the monoclonal anti-NGF antibody and a non-human animal parent line transgenic for the heavy chain of the anti-NGF antibody,

b) cross-breeding of the two transgenic parent animal lines

c) selection of the brood.

20 20. Method according to claim 19 wherein the step a) essentially comprises the introduction of the transcription unit containing the transgene encoding for the light chain of the anti-NGF antibody and the transcription unit containing the transgene encoding for the heavy chain of the anti-NGF antibody,





separately, in different fecundated oocytes and the selection of parents transgenic for either of the transgenes.

21. Use of the transgenic animal according to claim 1 as a model for the study of the pathologies related to an NGF deficit.
- 5 22. Use of the transgenic animal according to claim 21 wherein such a deficit results from the presence of anti-NGF auto-antibodies.
23. Use of the transgenic animal according to claim 1 as a model for the study of neurodegenerative syndromes.
24. Use of the transgenic animal according to claim 23 wherein the 10 neurodegenerative syndrome is the Alzheimer's disease.
25. Use of the transgenic animal according to claim 1 as a model for the study of the pathologies of the muscular system.
26. Use of the transgenic animal according to claim 1 for the selection of compounds effective in the treatment of pathologies included in the following 15 group:
  - neurodegenerative syndromes
  - muscular atrophy/dystrophy.
27. Use of the transgenic animal according to claim 26 wherein the neurodegenerative syndrome is the Alzheimer's disease.
- 20 28. Use of the NGF (Nerve Growth Factor) or peptide fragments thereof for the preparation of pharmaceutical compositions for the treatment of muscular pathologies.
29. Use of the NGF according to claim 28 wherein the NGF is provided as

*P. (P. De Donato - Dott.)*

one of the following forms:

- natural NGF
- recombinant NGF
- synthetic NGF

5      - NGF secreted by implant of genetically engineered cells

      - NGF coded by viral vectors.

30. Use of the NGF according to claim 29 wherein said treatment is provided by local administration.

31. Pharmaceutical compositions including NGF (Nerve Growth Factor) for  
10      the therapy of the muscular pathologies.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dr. Michael Bott". The signature is fluid and cursive, with "Dr." at the top, followed by "Michael" and "Bott" on separate lines.

NON-HUMAN TRANSGENIC ANIMALS ABLE TO EXPRESS ANTI-NGF ANTIBODIES

ABSTRACT

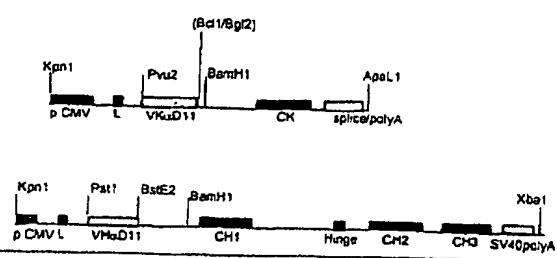
Non-human transgenic animals for an anti-NGF (Nerve Growth Factor) antibody able to mimic neurodegenerative syndromes, to be used as a model  
5 to study said pathologies and provide therapies therefor.

*M. Chávez Peña*

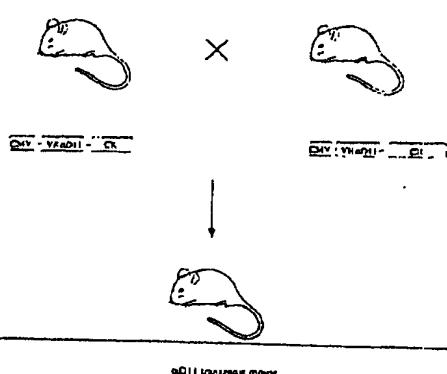
RM2000 A 000306

1/32

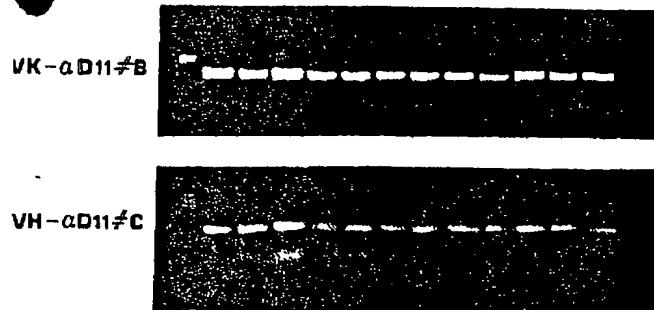
A



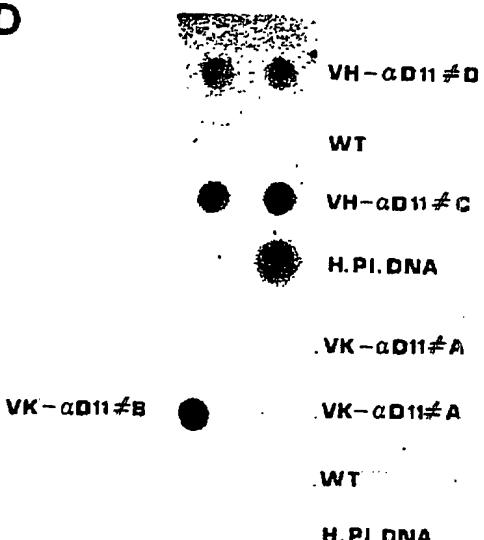
B



C

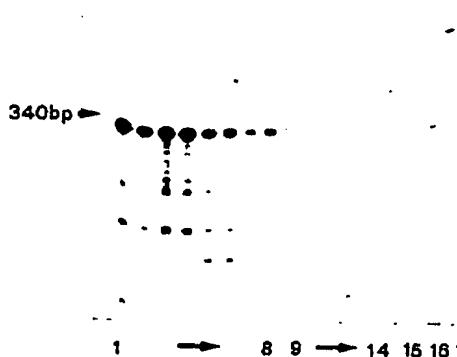


D



H. Barzani & Zanardo

E



F

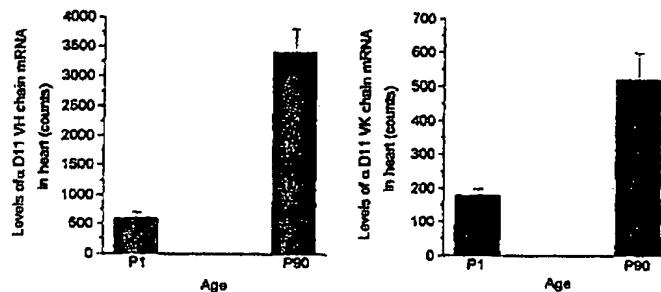


FIG. 1

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.D.A.

*degli ospiti*  
IN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



2/32



RM2000 A 000006



*di Francesco Zonta*

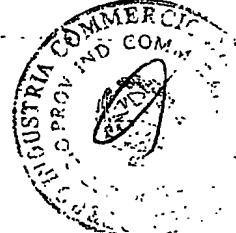
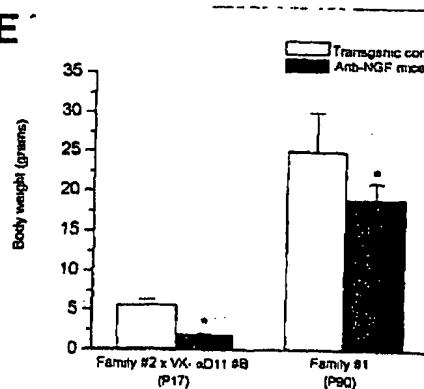


FIG. 2

P.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
donna Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

*donna Capasso*

3/32

RM2000 A 000306

A

B

C

D

FC

FC

CR

GCC

CR

E

F

G

H

I

L

M

N

Dr. Riccardo Zanardo

FIG. 3

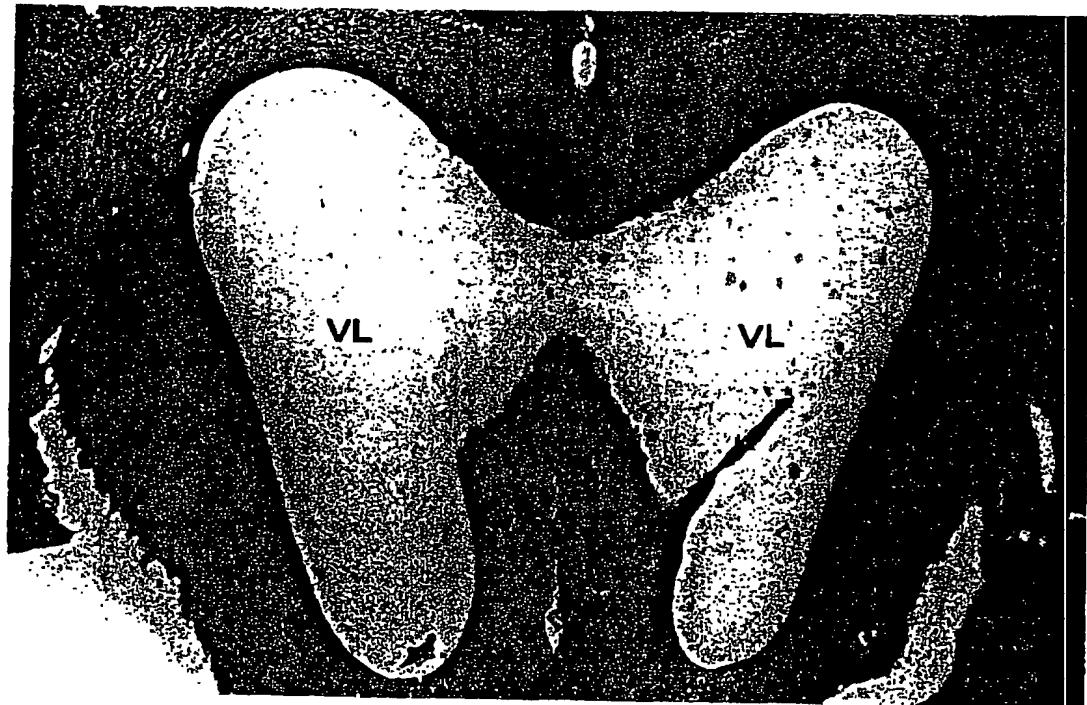
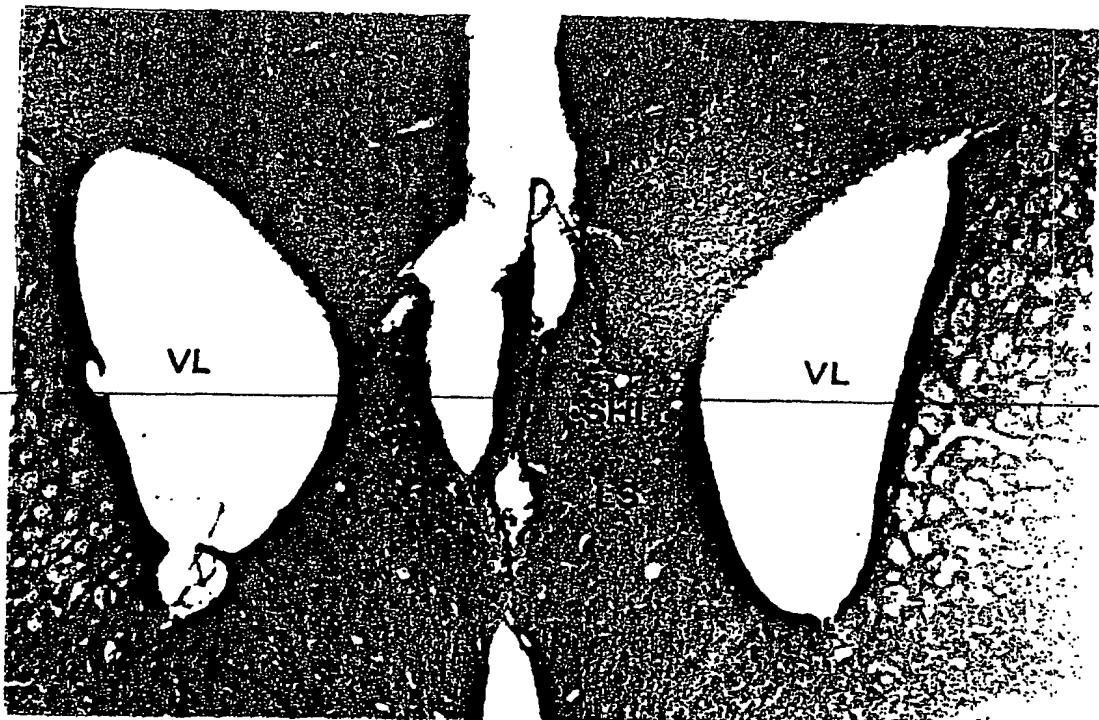
D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*dopo espresso*  
UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



4/32

RM2000 A 000366



J. Diderichsen Dok.

FIG. 4

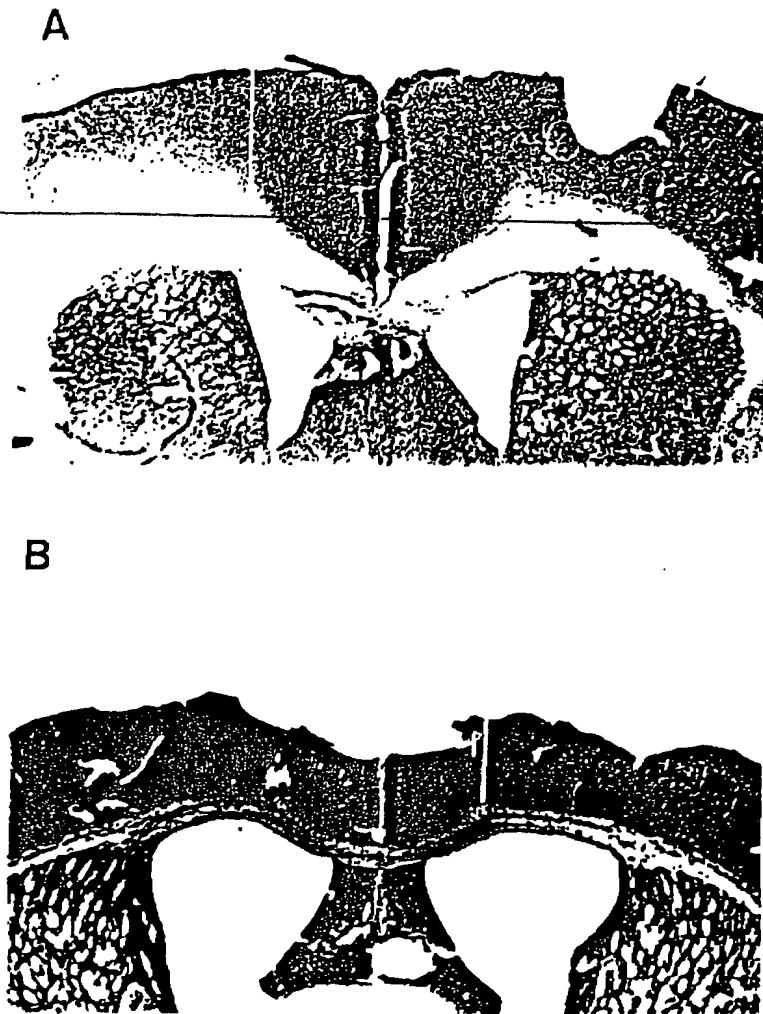
P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*degli ex pass*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



5/32

RM2000 A 000306



Dr. Adelmo Boff

FIG. 5

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

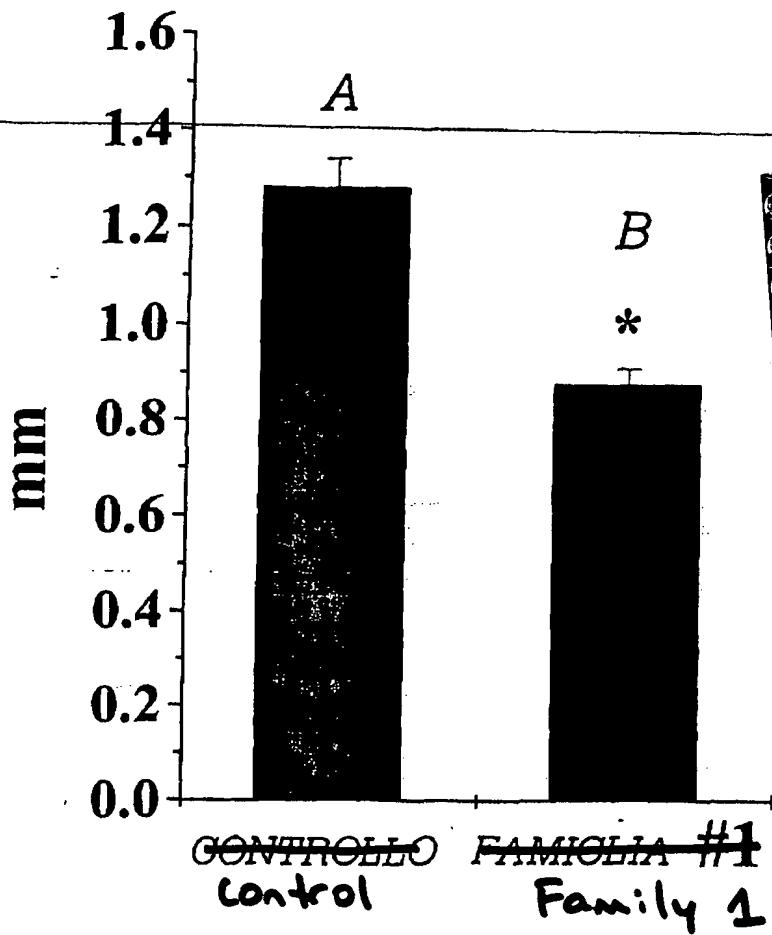
olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



6/32 RM2000 A 000306

~~SPESSORE CORTICALE~~  
Cortical Thickness



*D. Giandomenico Belotti*

~~control~~  
CONTROLLO : 1.282 +/- 0.059

~~FAMIGLIA #1~~: 0.879 +/- 0.033  
Family 1

FIG. 5c



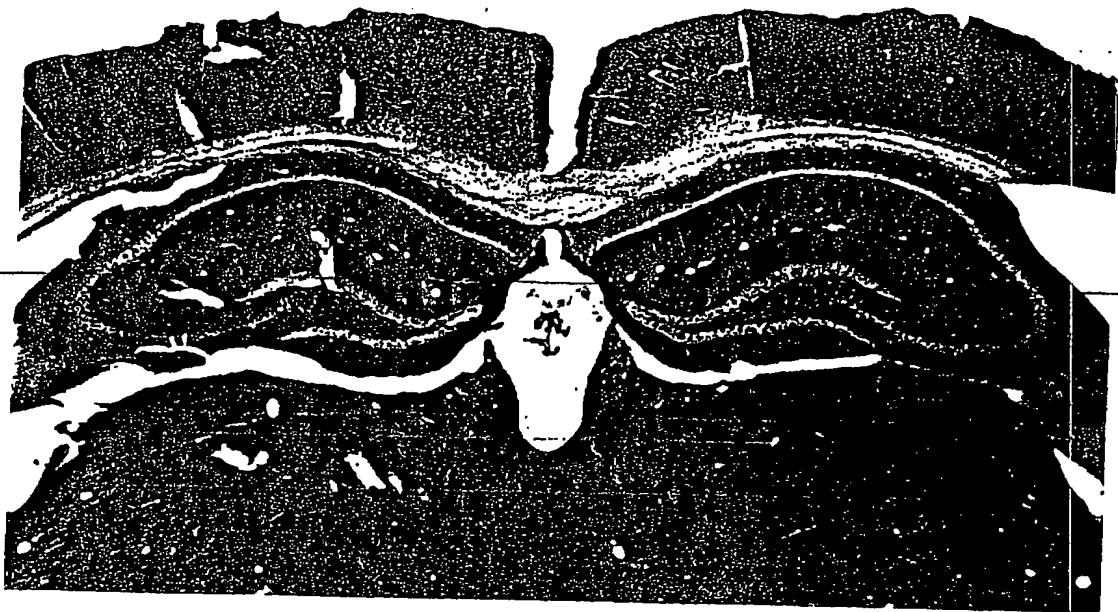
D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*olga capasso*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

A

7/32

RM2000 A.000306



B

Dr. Olga Capasso

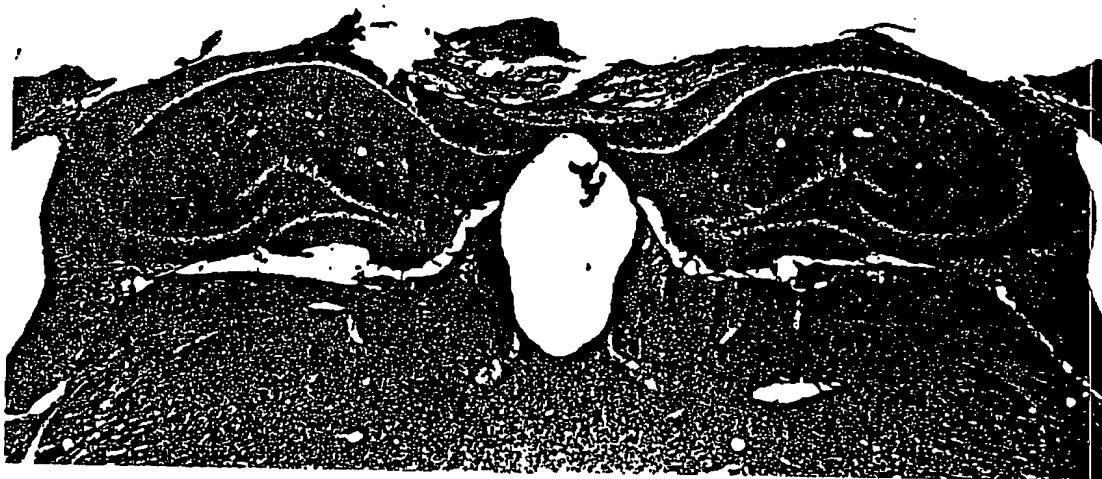


FIG. 6

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

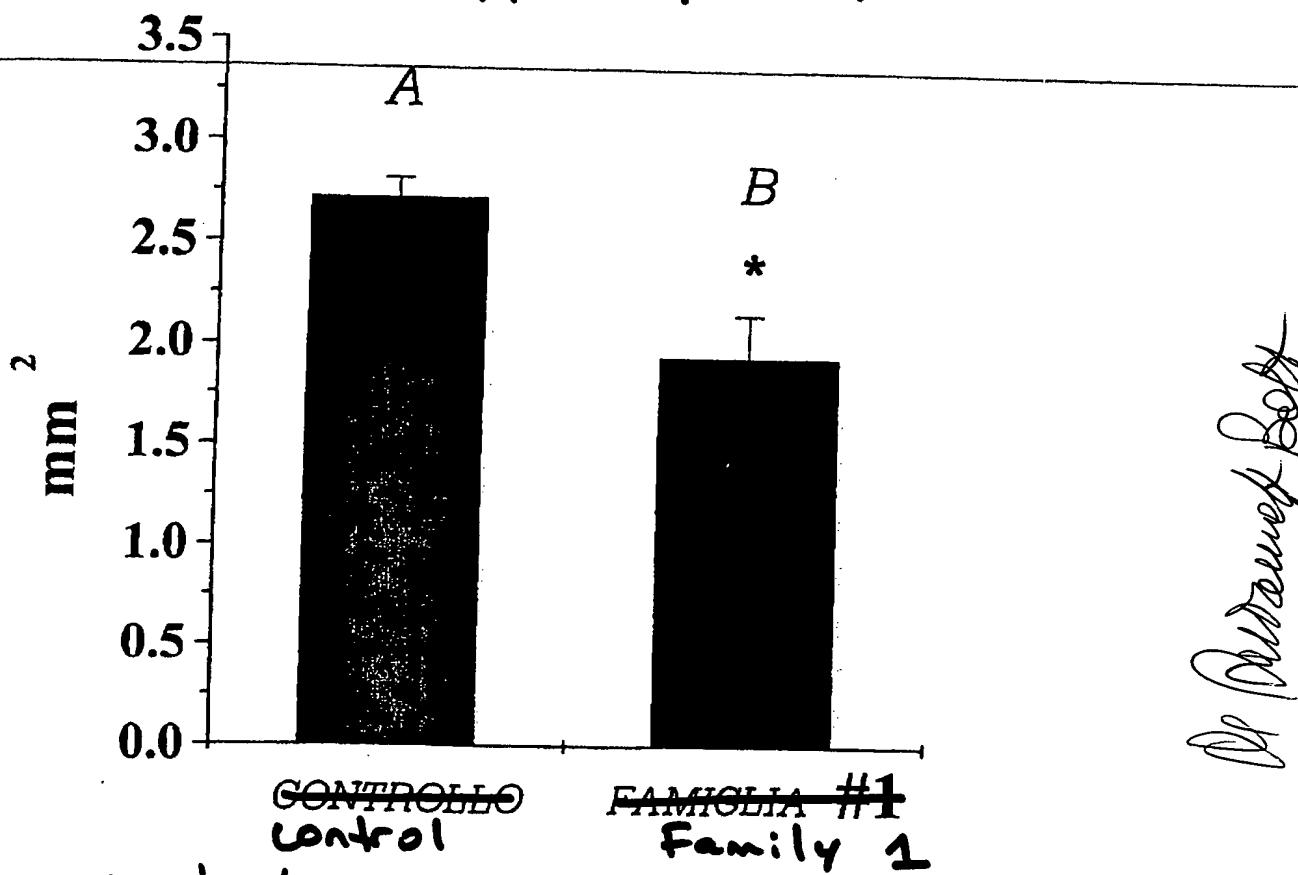
*olga capasso*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



8/32

RM2000 A 000306

~~SUPERFICIE DELL'IPPOCAMPO~~  
Hippocampus Area



~~Control~~  
CONTROLLO :  $2.72 \pm 0.098$

~~FAMIGLIA #1~~:  $1.94 \pm 0.211$   
Family 1

FIG. 6c

P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



*degli esemplari* **IN MANDATARIO**  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

9/32

A

RM2000 A 000306

B

Al Berenest Bank

FIG. 7

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



olga capasso

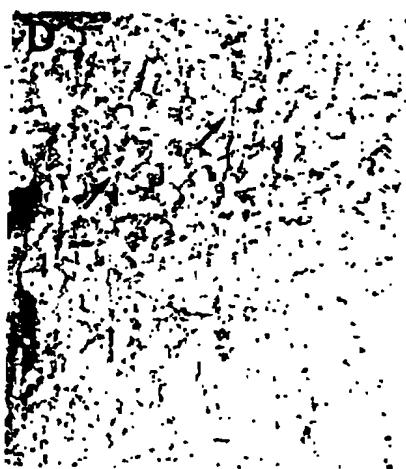
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

10/32 RM 2000 A 000306

A



B

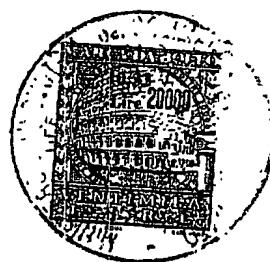


D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANI & ZANARDO ROMA S.D.A.

olga ca passo



FIG. 8



UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

11/32

RM2000 A 000306

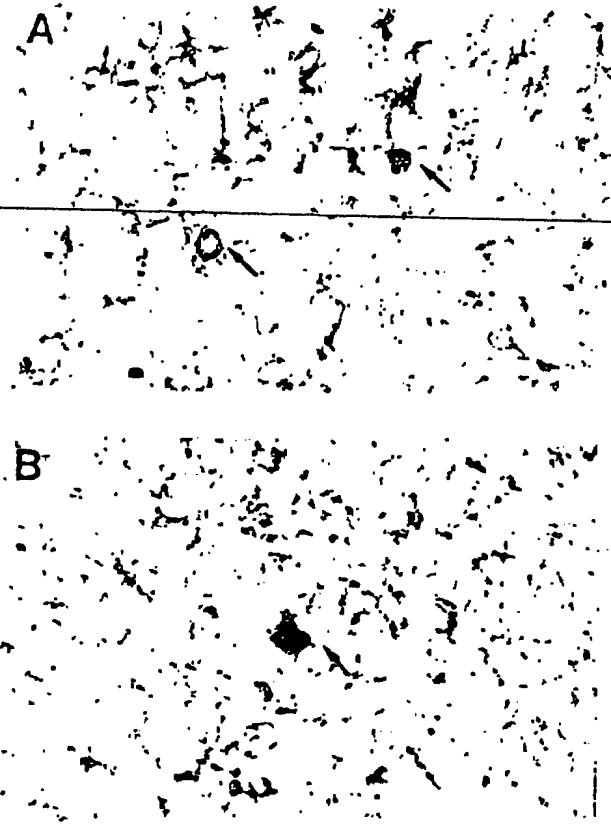


FIG. 9

Dr. Berti e altri

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

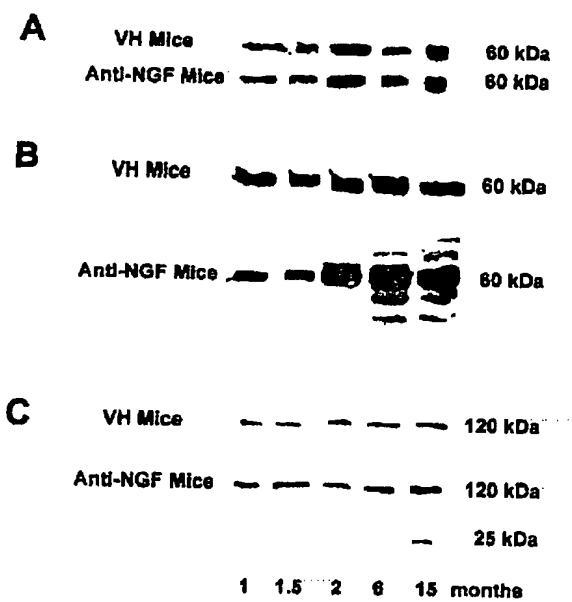
UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

de Gasca passo



12/32

RM 2000 A 000306



Olga Capasso

FIG. 10

D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'iscr. 820 B)

13/32

RM2000 A 000306

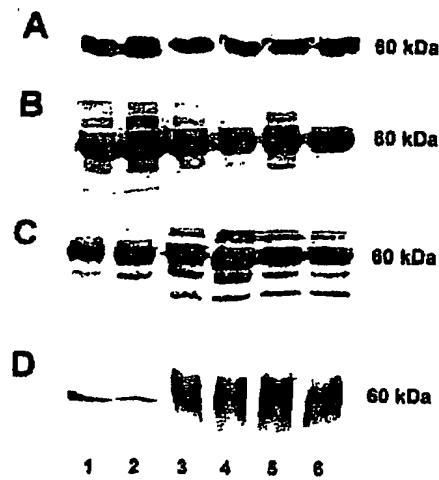


FIG. 11



P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

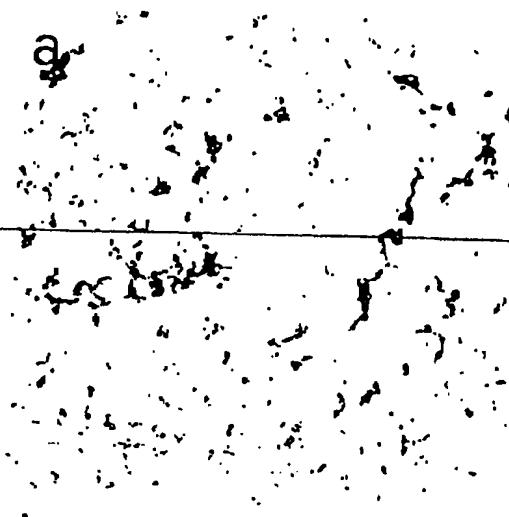
olga Capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

14/32

RM2000 A 000306

a



b



c



FIG. 12

D.D.I. S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

olga ce passo

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

15/32

RM2000 A 000306



FIG. 13

Al Polimento Sottili



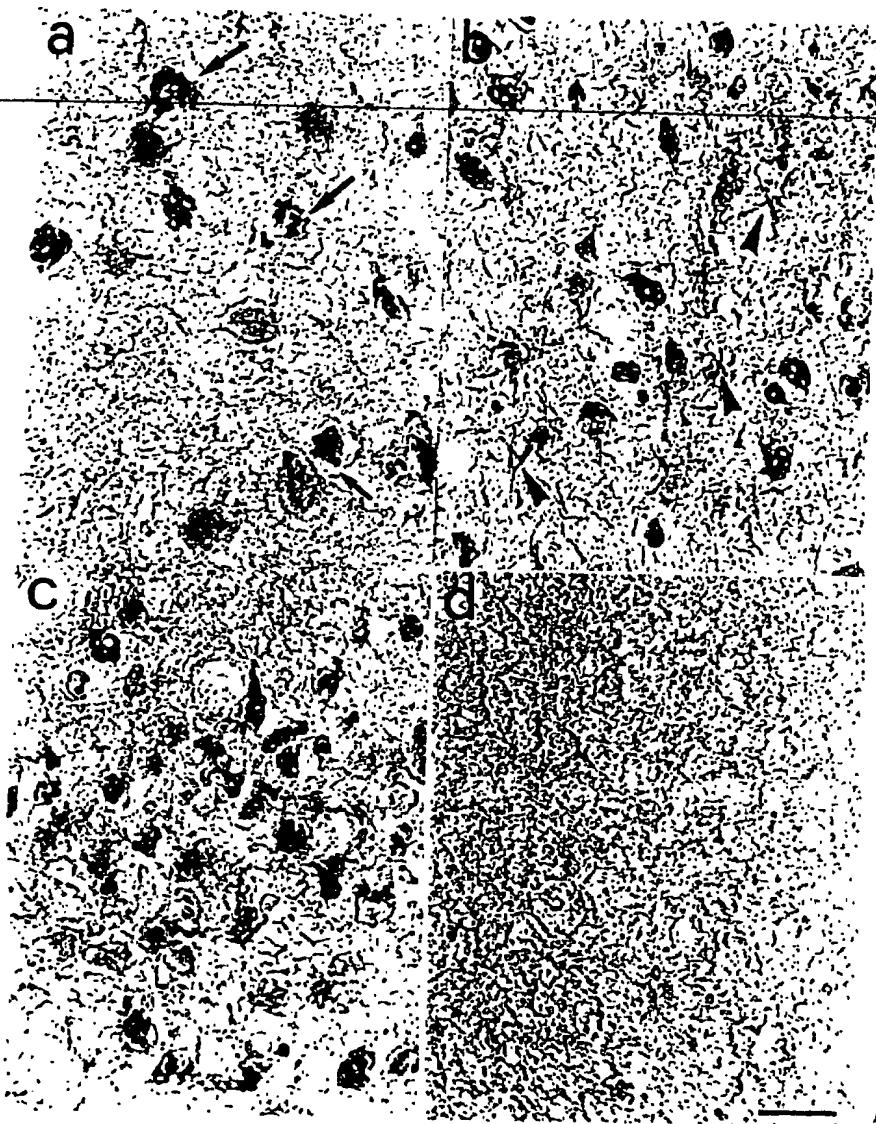
p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. "BARZANO" & "ZANARDO" ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(n. d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

16/32

RM2000 A 000306



M. (Signature)



FIG. 14

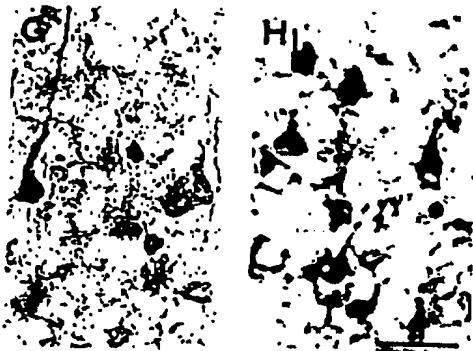
P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

deg. la passo

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

17/32

RM2000 A 000306



De Marentz Both

FIG. 15

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*degli esperti* *UN MANDATARIO*  
*per sé e per gli altri*  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



18/32 RM2000 A 000306

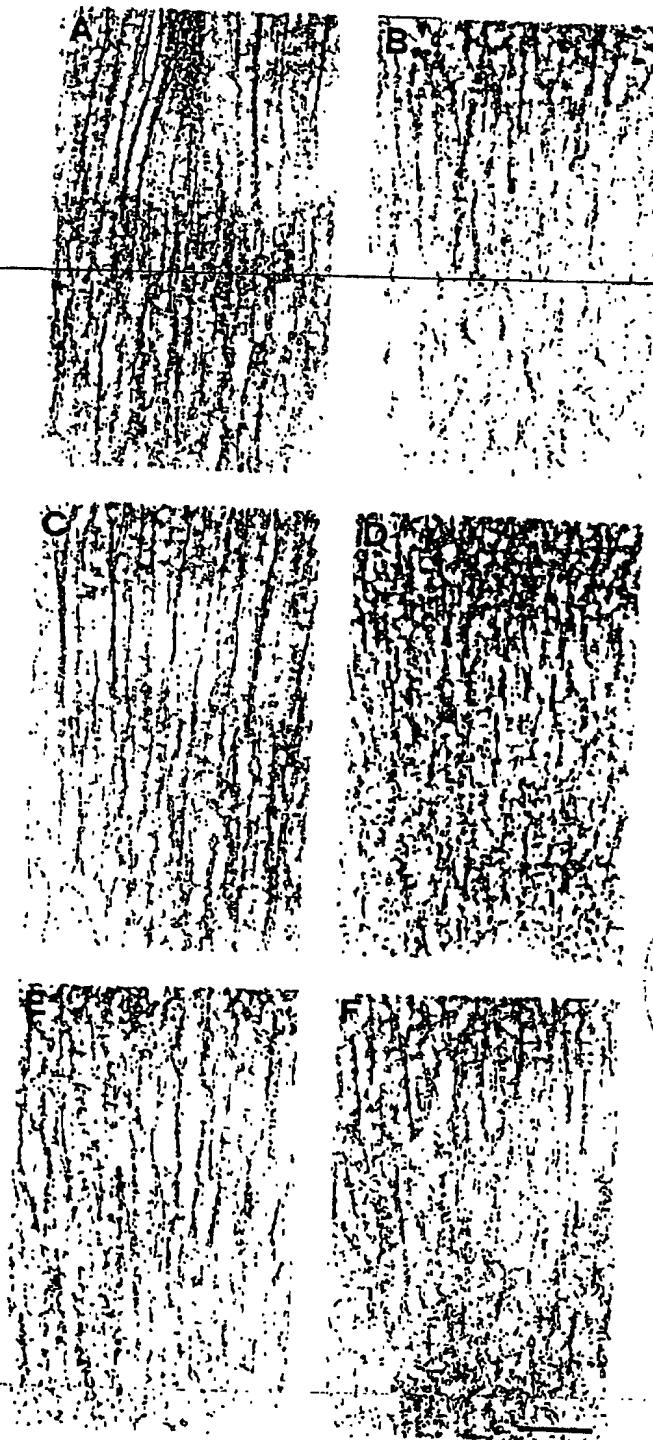


FIG. 16

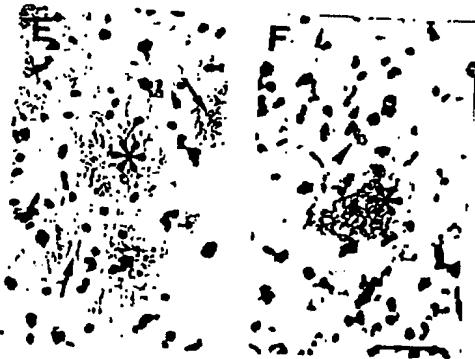
P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*dega ca pesce*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

19/32

RM2000 A 000306



M. Olga Capasso

FIG. 17

P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.D.A.

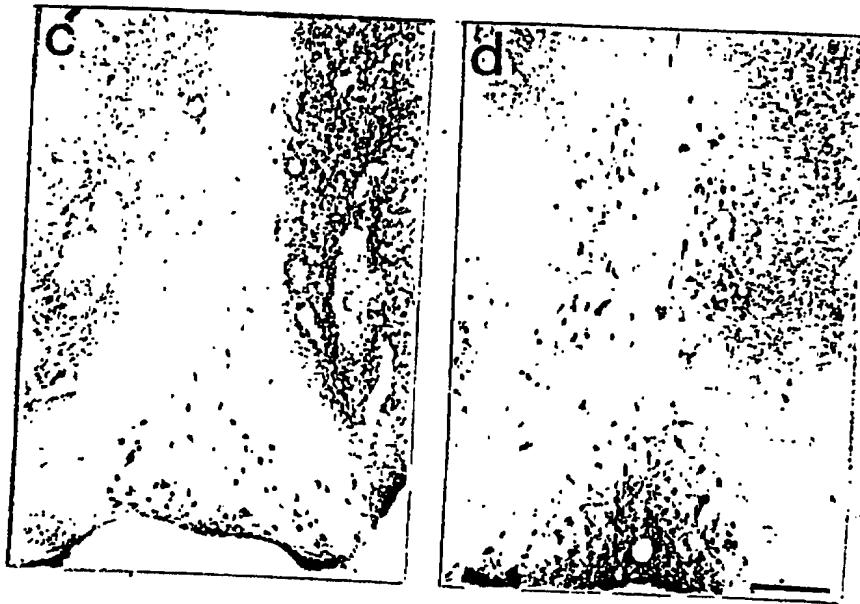
olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



20/32

RM2000 A 000306



M. Abramoff 1977

FIG. 18

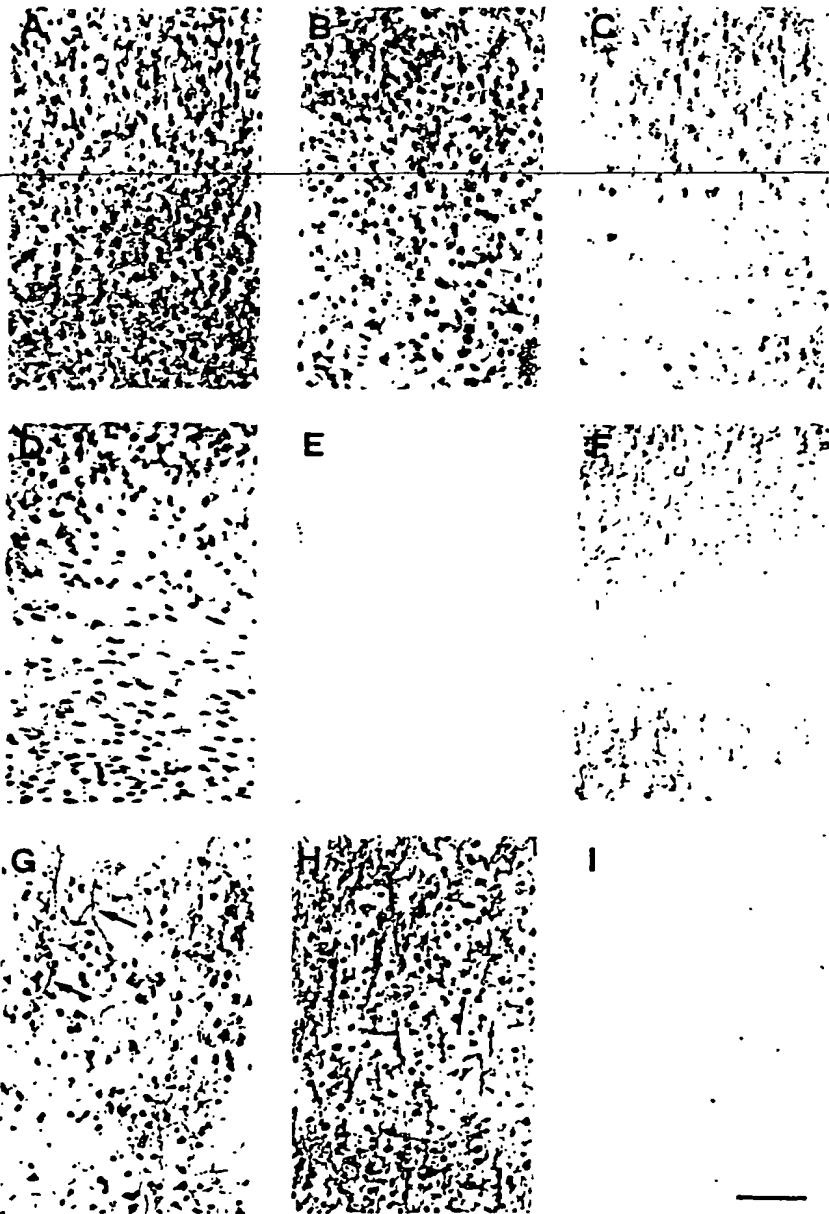


D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANI & ZANARDO ROMA S.O.A.

Olga Capasso  
UN MANDATARIO  
per me e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

21/32

RM 2000 A 000306



Mr. B. D. Tamm, Boston



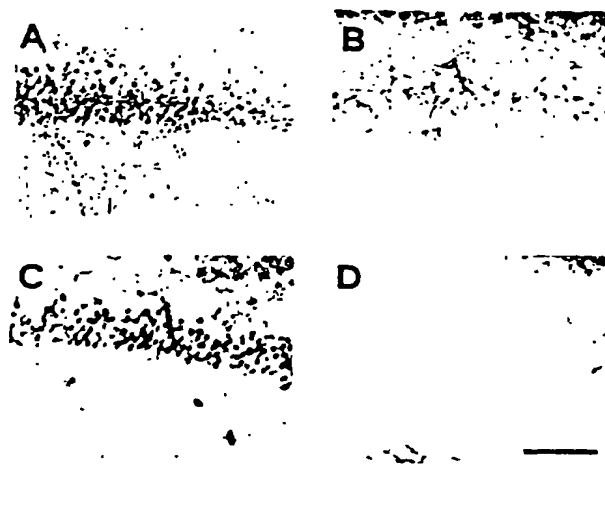
FIG. 19

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.D.A.

*degli es pressi*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'iscr. 820 B)

22/32

RM2000 A 000306



*Olga Capasso*

FIG. 20



o.o.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO! & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

*de capasso*

23/32

RM 2000 A 000306



E F G H

FIG. 21



P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'iscr. 820 B)

deve ce passa

24/32

RM2000 A 000306

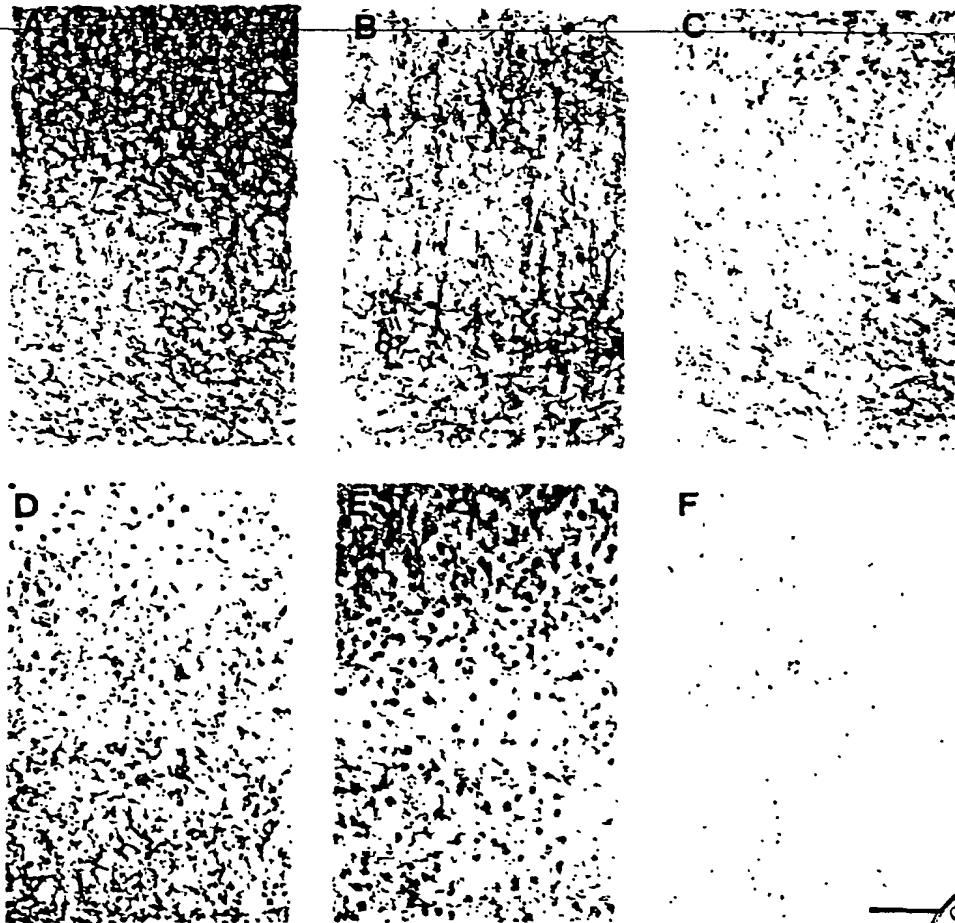
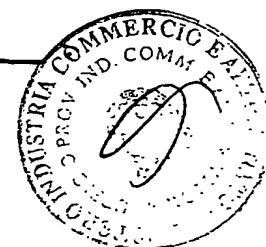


FIG. 22

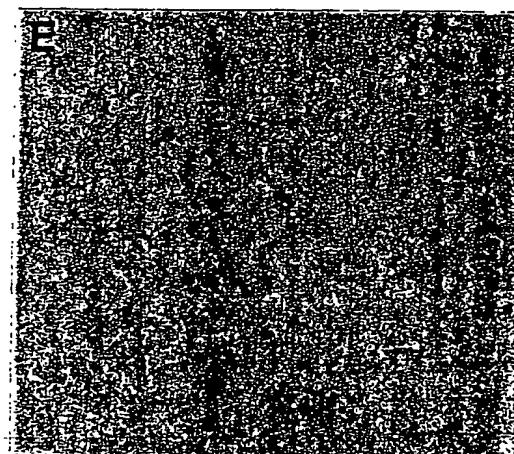
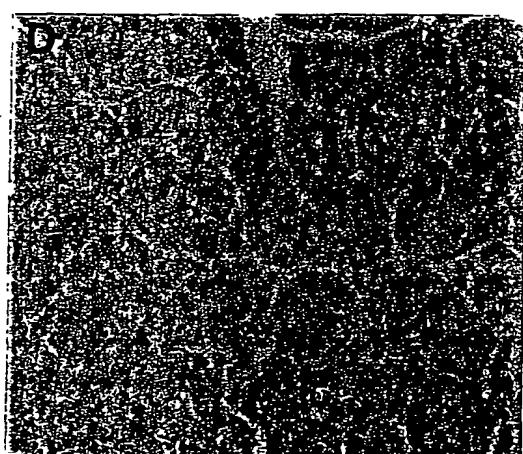
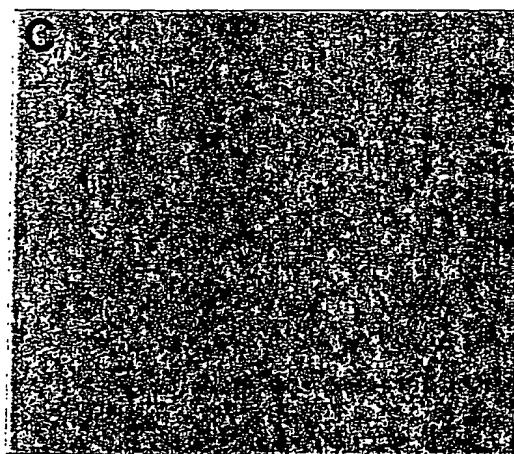
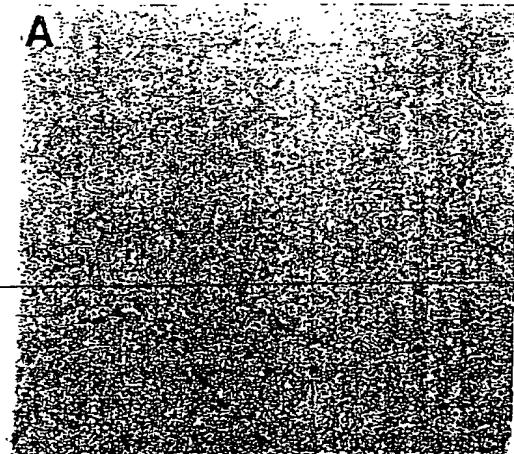


p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.D.A.

**UN MANDATARIO**  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

25/32

RM2000 A 000306



*Mr. Belmonte Boffa*



FIG. 23

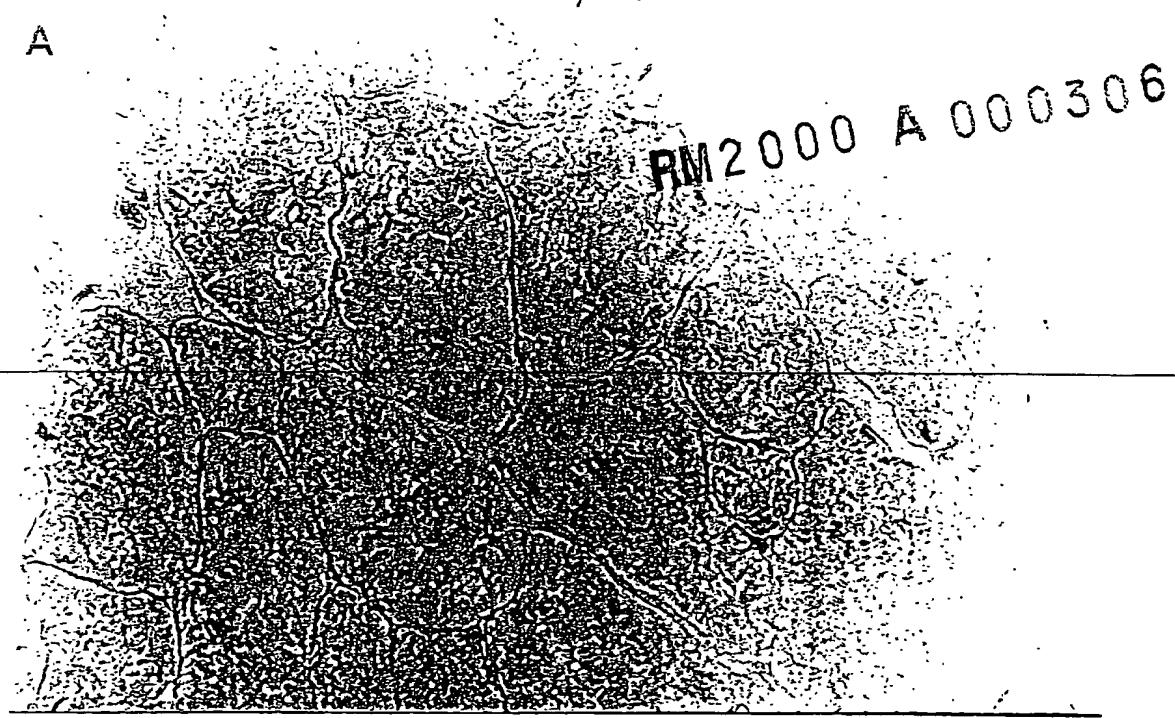
D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*olga ce pess*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

26/32

A



B

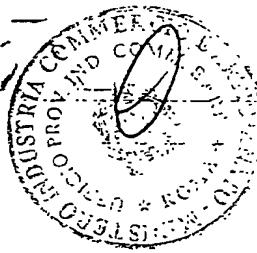


FIG. 24

P.D.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*dgs ce pe ss*

UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'iscr. 820 B)

27/32 RM2000 A 000306

A.



Ho spedito (M)

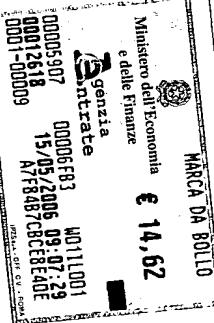


FIG. 25

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

olga capasso

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(Nº d'iscr. 820 B)

28/32

RM2000 A 000306



R. Belotti Betti

FIG. 26

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso



29/32

RM 2000 A 000306

*Verde marrone*

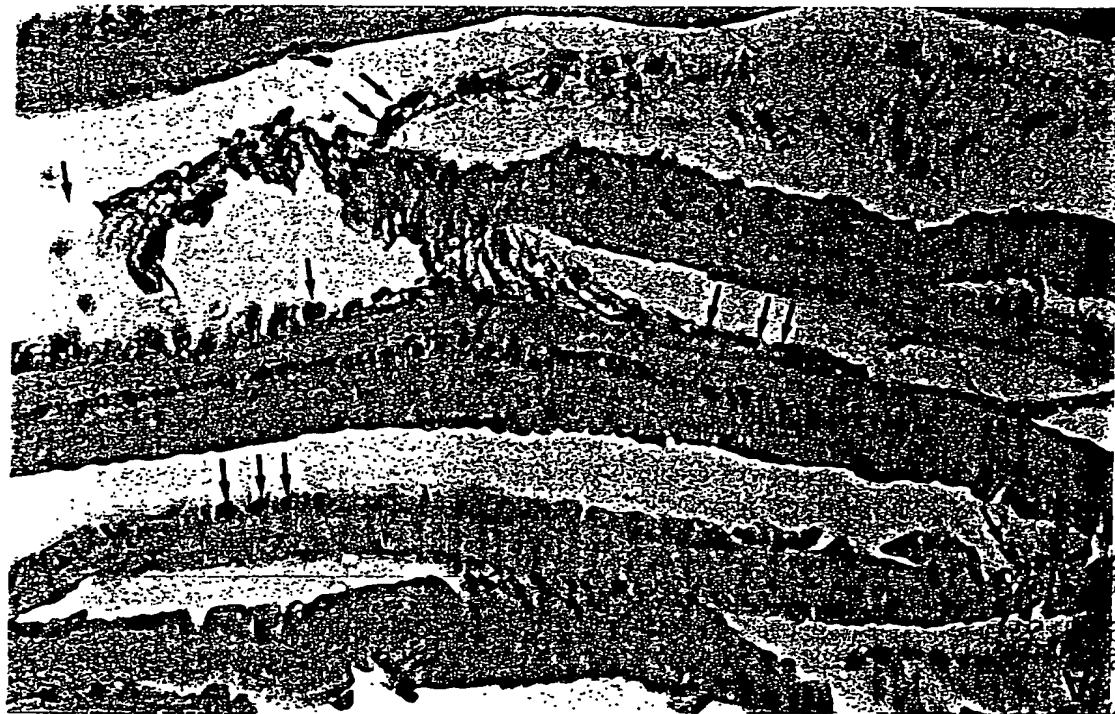


FIG. 27

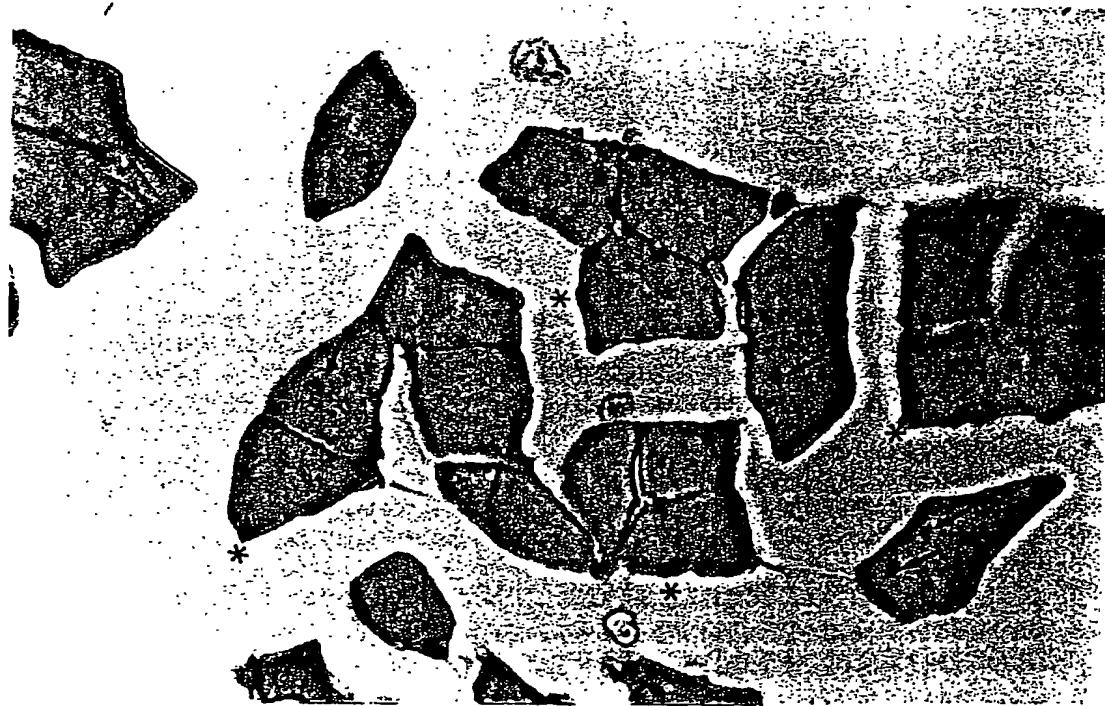
R.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
R.P.: BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

30/32

RM2000 A 000306



Olga Capasso

FIG. 28



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

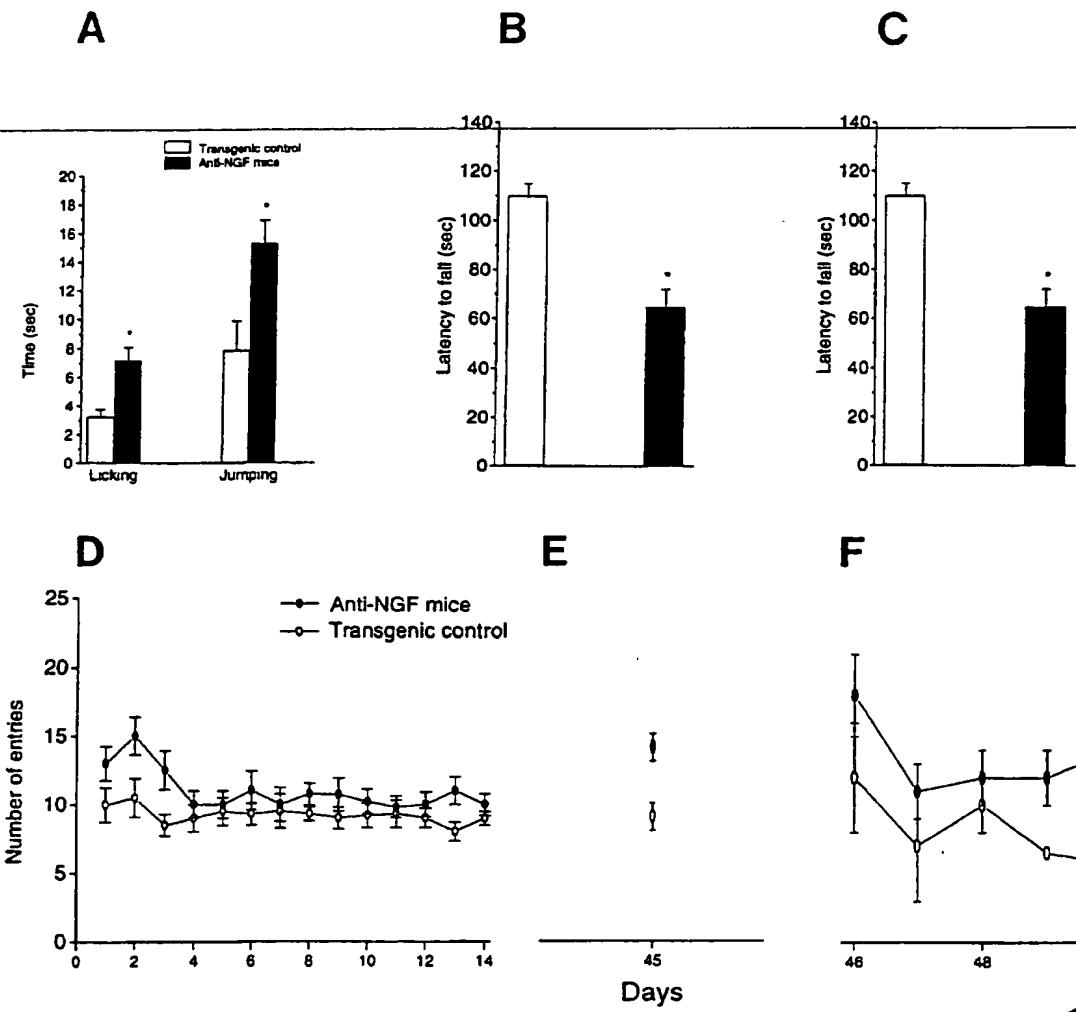
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

degca passo



31 / 32

RM2000 A 000306



P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

**UN MANDATARIO  
per se e per gli altri**  
**Olga Capasso**  
**(N° d'iscr. 820 B)**

dogs cross

TRIBUNALE DI ROMA

Ufficio Atti Notori - Perizie e Traduzioni

VERBALE DI GIURAMENTO

Ad di 23/05/2006 avanti al sottoscritto Cancelliere è presente il

Signor: MARIA ANTONIETTA BOTTA'

documento: PAT. GUIDA N. RM 6148598 P

riliasciato da MCTC-RM il 09/01/2003

il quale chiede di asseverare con giuramento il suesteo atto. Io  
Cancelliere, previe ammonizioni di legge, invito il comparente al  
giuramento, che egli presta ripetendo: "Giuro di avere bene e fedelmente  
adempito all'incarico affidatomi al solo scopo di far conoscere la verità".

Letto, confermato e sottoscritto.

Maria Antonietta Botta

IL DIRETTORE DI CANCELLERIA/  
(Giovanna Dionette)



giovanna dionette

CRONOLOGICO

N. 5746

Roma, 09/05/2006

IL COLLABORATORE

32/32

RM2000 A 000306

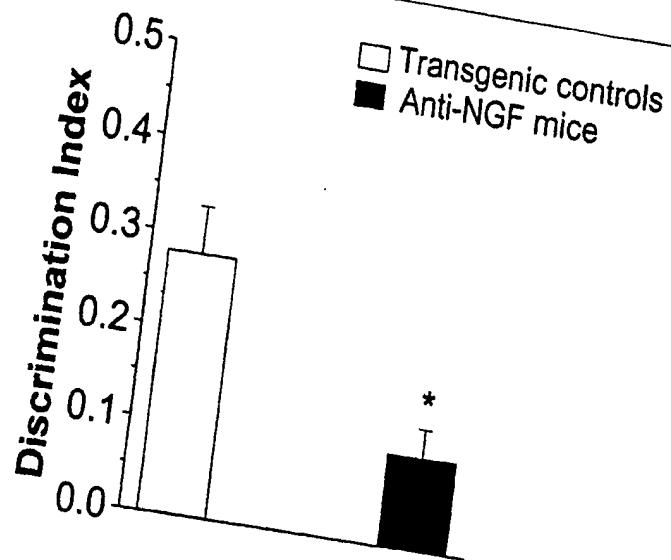


FIG. 30

P.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*Olga Capasso*  
UN. MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**